



Ana Rita Santos Marques

Licenciada em Biotecnologia

**Implementação e validação de um método Cromatográfico para a
determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais,
frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, Professora Auxiliar,
FCT/UNL

Co- orientador: Mestre Vera Canelas, Responsável Técnica do Laboratório da Química, SGS

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL

Arguente: Doutora Carla Alexandra Fino Alberto da Motta, INSA

Vogal: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, FCT/UNL

Setembro, 2019



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



Ana Rita Santos Marques

Licenciada em Biotecnologia

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, Professora Auxiliar,
FCT/UNL

Co- orientador: Mestre Vera Canelas, Responsável Técnica do Laboratório da Química, SGS

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL

Arguente: Doutora Carla Alexandra Fino Alberto da Motta, INSA

Vogal: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, FCT/UNL

Setembro, 2019



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS Copyright © 2019 de Ana Rita Santos Marques, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Agradecimentos

A realização desta dissertação marca o termo de uma importante etapa da minha vida e só foi possível graças à colaboração e ao contributo de diversas pessoas. A todas elas quero expressar a minha sincera gratidão.

Em primeiro lugar quero agradecer à professora Ana Lúcia Leitão por ter aceitado ser minha orientadora e dessa forma me ter proporcionado a oportunidade de realizar este projeto. Agradeço o apoio, motivação, disponibilidade e conhecimentos transmitidos que sempre me concedeu ao longo de todo o percurso da realização desta dissertação e de todo o percurso académico.

À SGS, pelo privilégio de ingressar numa empresa de elevado prestígio a nível mundial, assim como pela disponibilização de todos os meios para a realização deste trabalho.

À Mestre Vera Canelas, responsável técnica do laboratório da Química da SGS, pela amabilidade com que me recebeu, pelo apoio e partilha de conhecimentos e experiência científica necessários à realização desta dissertação. Quero agradecer também a toda a equipa do laboratório da Química pela simpatia e pelos conhecimentos que me passaram.

Ao Mestre Daniel Silveira, responsável técnico, por toda a dedicação e orientação prestada ao longo destes meses, assim como todo o conhecimento transmitido e disponibilidade para me ajudar sempre que necessário.

Aos meus colegas e amigos de mestrado, em especial ao Rúben Ramalho e à Helena Pereira, pelo companheirismo, boa disposição e pelas valiosas tardes de estudo.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer aos meus pais e ao meu irmão, que sempre me apoiaram incondicionalmente e incentivaram as minhas decisões durante o meu percurso académico. Ao meu namorado João Lopes pela paciência, força e incentivo que me transmitiu ao longo da realização deste trabalho.

Um sincero obrigado a todos!

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Resumo

Os cloratos e percloratos são contaminantes químicos libertados para o ambiente a partir de fontes naturais e antropogénicas, acumulando-se no solo e na água, e dessa forma podem contaminar os alimentos e a água potável. Para além disso os cloratos e percloratos têm sido associados a inúmeros efeitos negativos na saúde, como a inibição da captação de iodo por parte da glândula tiroide. Deste modo, de forma a monitorizar os níveis de cloratos e percloratos em amostras de frutos, vegetais e cereais o objetivo do presente trabalho foi a implementação e validação de uma metodologia analítica para a determinação de cloratos e percloratos por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (UPLC-MS/MS), no laboratório da SGS – Société Générale de Surveillance. De forma a garantir a fiabilidade dos resultados analíticos obtidos foram avaliados parâmetros de validação como a linearidade, limites de deteção e quantificação, repetibilidade e precisão intermédia, exatidão e incertezas de medição. Tendo em conta que estes parâmetros se encontram dentro dos critérios estabelecidos para a validação de um método analítico, considera-se que o objetivo proposto foi cumprido e que o método pode ser utilizado em análises de rotina.

Palavras-chaves: Cloratos, Percloratos, UPLC-MS/MS, Implementação, Validação, Produtos de origem vegetal

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Abstract

Chlorates and perchlorates are chemical contaminants released into the environment from natural and anthropogenic sources, that accumulate in soil and water, and thus can contaminate food and drinking water. In addition, chlorates and perchlorates have been associated with several negative effects on human health, such as the inhibition of iodine uptake by the thyroid gland. So to monitor chlorate and perchlorate levels in fruits, vegetables and cereals samples, the objective of the present work was the implementation and validation of an analytical methodology for the determination of chlorates and perchlorates by Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS / MS) at the SGS laboratory - Société Générale de Surveillance. In order to ensure the reliability of the analytical results obtained, validation parameters such as linearity, detection and quantification limits, repeatability and intermediate precision, accuracy and measurement uncertainties were evaluated. Given that these parameters are within the criteria established for the validation of an analytical method, it is considered that the proposed objective has been met and the method can be used for routine analysis.

Keywords: Chlorates, Perchlorates, UPLC-MS/MS, Implementation, Validation, Products of plant origin

Índice de Matérias

Enquadramento	1
1. Société Générale de Surveillance (SGS)	3
1.1 A Empresa	3
1.2 História	3
1.3 SGS em Portugal	4
1.3.1 Laboratórios da SGS Portugal	4
1.4 Serviços	5
2. Percloratos e Cloratos	7
2.1 Percloratos	7
2.1.1 Fontes de contaminação de percloratos	7
2.1.2 Exposição aos percloratos	9
2.2 Cloratos	10
2.2.1 Fontes de contaminação de cloratos	11
2.2.2 Exposição aos cloratos	12
2.3 Legislação	13
3. Método analítico para a determinação de percloratos e cloratos	15
4. Cromatografia	17
4.1 Teoria da cromatografia	17
4.1.1 Tempo de retenção	17
4.1.2 Fator de capacidade	18
4.1.3 Seletividade	18
4.1.4 Resolução	19
4.1.5 Eficiência da coluna	19
4.2 Cromatografia Líquida (LC)	20
4.3 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)	21
4.4 Sistema UPLC	22
4.4.1 Bomba	22
4.4.2 Coluna cromatográfica	23
4.4.3 Injetor	25
5. Espectrometria de massa (MS)	27
5.1 Espectrometria de massa em tandem (MS/MS)	27
5.2 Método de ionização	27
5.2.1 Ionização por <i>electrospray</i> (ESI)	28
5.3 Analisador de massas	28
5.3.1 MS/MS – Triplo Quadrupolo (QqQ) e MS Single	29
6. Método de extração	31

6.1 Calibração correspondente à matriz sem Padrão Interno (IS)	33
7. Validação do método analítico	35
7.1 Parâmetros estudados no processo de validação do método	35
7.1.1 Reta de calibração	35
7.1.2 Gama de Trabalho/Linearidade	36
7.1.2.1 Teste dos residuais	37
7.1.2.2 Teste de Grubbs	37
7.1.3 Especificidade/Seletividade	38
7.1.4 Limite de deteção (LD) e Limite de quantificação (LQ)	38
7.1.5 Exatidão	39
7.1.5.1 Ensaio de recuperação	40
7.1.6 Precisão	40
7.1.6.1 Repetibilidade	40
7.1.6.2 Precisão intermédia	41
7.1.7 Incertezas de medição	42
7.1.7.1 Incerteza associada à precisão e exatidão do método	42
7.1.7.2 Incerteza Combinada	43
7.1.7.3 Incerteza Expandida	43
7.1.8 Razão iónica	43
8. Parte experimental	45
8.1 Material e Equipamento	45
8.2 Reagentes e preparação de soluções	45
8.2.1 Preparação das soluções padrão e de controlo	46
8.2.2 Reta de calibração em extrato	46
8.2.3 Reta de calibração em extrato de sopas para cloratos e percloratos	47
8.2.4 Preparação das fortificadas para o ensaio de recuperação	48
8.2.5 Reta de calibração em solvente, MeOH	48
8.3 Amostras	48
8.3.1 Amostras para a implementação e validação do método	48
8.3.2 Amostras reais	49
8.3.3 Preparação e extração das amostras pelo método QuPpe	49
8.4 Condições cromatográficas	49
9. Resultados e discussão	51
9.1 Gama de trabalho e Linearidade	51
9.2 Especificidade e Seletividade	58
9.3 Limite de Deteção e Quantificação	59
9.4 Exatidão	60

9.5 Precisão	64
9.5.1 Repetibilidade	64
9.5.2 Precisão intermédia	67
9.5.2.1 Controlo de duplicados	72
9.6 Incerteza da medição	76
9.7 Teores de cloratos e percloratos obtidos para as matrizes em estudo	77
9.8 Análise de amostras reais	78
10. Conclusões	81
Referências Bibliográficas	83
 Anexo 1. Razão iónica	 90
Anexo 2. Reta Solvente	93

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Logótipo da SGS (SGS, 2017a)	3
Figura 2.1 - Estrutura química do ião perclorato	7
Figura 2.2 - Estruturas de ressonância de cloratos (EFSA, 2015b)	10
Figura 4.1 - Cromatograma com os parâmetros utilizados para a caracterização dos picos cromatográficos. Adaptado de: Nagy & Vékey (2008)	20
Figura 5.1 - Configuração do analisador de massa triplo quadrupolo operado no modo MRM (dois ou mais fragmentos). Adaptado de: Locatelli (2012)	30
Figura 6.1 - Resumo do método de extração QuPPE	32
Figura 9.1 - Reta de calibração para a determinação dos percloratos no Arroz na gama de concentrações: 0,0025 a 0,05 µg/mL, no dia 27/08/18	53
Figura 9.2 - Reta de calibração para a determinação dos percloratos na Cenoura na gama de concentrações 0,005 a 0,05 µg/mL, no dia 25/09/18	54
Figura 9.3 - Reta de calibração para a determinação dos cloratos no Arroz na gama de concentrações 0,0025 a 0,05 µg/mL, no dia 27/08/18	55
Figura 9.4 - Reta de calibração para a determinação dos cloratos na Cenoura na gama de concentrações 0,005 a 0,05 µg/mL, no dia 25/09/18	56
Figura 9.5 - Cromatograma do padrão de controlo 2 (PC2) dos percloratos	58
Figura 9.6 - Cromatograma do padrão de controlo 2 (PC2) dos cloratos	58
Figura A2.1 - Reta de calibração em solvente dos cloratos na gama de concentrações 0,00500 a 0,0500 (µg/mL), na transição 85>69,2	94
Figura A2.2 - Reta de calibração em solvente dos cloratos na gama de concentrações 0,00500 a 0,0500 (µg/mL), na transição 83>67	95

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Níveis de perclorato como referência para o comércio na EU	13
Tabela 8.1 - Volumes de solução intermédia e de extrato utilizados para a preparação dos pontos de calibração das retas elaboradas nas matrizes de frutos e vegetais	47
Tabela 8.2 - Volumes de solução intermédia e de extrato utilizados para a preparação dos pontos de calibração das retas elaboradas nas matrizes de cereais	47
Tabela 8.3 - Volumes de solução intermédia e de extrato utilizados para a preparação dos pontos de calibração das retas elaboradas nas matrizes das sopas	47
Tabela 8.4 - Volumes de solução intermédia 1 na fortificação das matrizes de frutos, vegetais e cereais	48
Tabela 8.5 - Condições cromatográficas do método	50
Tabela 9.1 - Padrões da reta de calibração para a determinação dos percloratos no arroz e respectivas áreas dos picos cromatográficos da transição 99 > 83 do dia 27/08/18	53
Tabela 9.2 - Testes dos Residuais e de Grubbs nos pontos de calibração da reta para a determinação de percloratos no arroz no dia 27/08/18	53
Tabela 9.3 - Padrões da reta de calibração para a determinação dos percloratos na cenoura e respectivas áreas dos picos cromatográficos da transição 99 > 83 do dia 25/09/18	54
Tabela 9.4 - Testes dos Residuais e de Grubbs nos pontos de calibração da reta para a determinação de percloratos na cenoura no dia 25/09/18	54
Tabela 9.5 - Padrões da reta de calibração para a determinação dos cloratos no arroz e respectivas áreas dos picos cromatográficos da transição 83 > 67 do dia 27/08/18	55
Tabela 9.6 - Testes dos Residuais e de Grubbs nos pontos de calibração da reta para a determinação de cloratos no arroz no dia 27/08/18	55
Tabela 9.7 - Padrões da reta de calibração para a determinação dos cloratos na cenoura e respectivas áreas dos picos cromatográficos da transição 83 > 67 do dia 25/09/18	56
Tabela 9.8 - Testes dos Residuais e de Grubbs nos pontos de calibração da reta para a determinação de cloratos na cenoura no dia 25/09/18	56
Tabela 9.9 - Equações das retas efetuadas em matriz para a determinação dos percloratos e respectivos coeficientes de determinação (R^2)	57
Tabela 9.10 - Equações das retas efetuadas em matriz para a determinação dos cloratos e respectivos coeficientes de determinação (R^2)	57

Tabela 9.11 - Limiares analíticos para os percloratos nas diferentes matrizes	59
Tabela 9.12 - Limiares analíticos para os cloratos nas diferentes matrizes	60
Tabela 9.13 - Ensaios de recuperação com 0,0100 e 0,0300 mg/kg de percloratos na cenoura	61
Tabela 9.14 - Ensaios de recuperação com 0,0100 e 0,0300 mg/kg de cloratos na cenoura	62
Tabela 9.15 - Resumo dos resultados obtidos no ensaio de recuperação de percloratos nas matrizes em estudo	63
Tabela 9.16 - Resumo dos resultados obtidos no ensaio de recuperação de cloratos nas matrizes em estudo	63
Tabelas 9.17 - Análise dos resultados obtidos para o limite de repetibilidade para a matriz cenoura fortificada com 0,0100 mg/kg de percloratos no dia 25/09/18	64
Tabela 9.18 - Análise dos resultados obtidos para o limite de repetibilidade para a matriz cenoura fortificada com 0,0300 mg/kg de percloratos no dia 25/09/18	64
Tabelas 9.19 - Análise dos resultados obtidos para o limite de repetibilidade para a matriz cenoura fortificada com 0,0100 mg/kg de cloratos no dia 25/09/18	65
Tabelas 9.20 - Análise dos resultados obtidos para o limite de repetibilidade para a matriz cenoura fortificada com 0,0300 mg/kg de cloratos no dia 25/09/18	65
Tabela 9.21 - Análise dos resultados obtidos para o limite de repetibilidade das matrizes em estudo, fortificadas com 0,0100 mg/kg de percloratos	65
Tabela 9.22 - Análise dos resultados obtidos para os limites de repetibilidade das matrizes em estudo, fortificadas com 0,0200 mg/kg (cereais) e 0,0300 mg/kg (frutos e vegetais) de percloratos	66
Tabela 9.23 - Análise de resultados obtidos para o limite de repetibilidade das matrizes em estudo, fortificadas com 0,0100 mg/kg cloratos	66
Tabela 9.24 - Análise dos resultados obtidos para os limites de repetibilidade das matrizes em estudo, fortificadas com 0,0200 mg/kg (cereais) e 0,0300 mg/kg (frutos e vegetais) de cloratos	67
Tabelas 9.25 - Análise dos resultados obtidos para a precisão intermédia para a matriz cenoura fortificada com 0,0100 mg/kg de percloratos	68
Tabelas 9.26 - Análise dos resultados obtidos para a precisão intermédia para a matriz cenoura fortificada com 0,0300 mg/kg de percloratos	68

Tabelas 9.27 - Análise dos resultados obtidos para a precisão intermédia para a matriz cenoura fortificada com 0,0100 mg/kg de cloratos	69
Tabelas 9.28 - Análise dos resultados obtidos para a precisão intermédia para a matriz cenoura fortificada com 0,0300 mg/kg de cloratos	69
Tabela 9.29 - Análise dos resultados obtidos para a precisão intermédia das matrizes em estudo, fortificadas com 0,0100 mg/kg de percloratos	70
Tabela 9.30 - Análise dos resultados obtidos para a precisão intermédia das matrizes em estudo fortificadas com 0,0200 mg/kg (cereais) e 0,0300 mg/kg (frutos e vegetais) de percloratos	70
Tabela 9.31 - Análise dos resultados obtidos para a precisão intermédia das matrizes em estudo fortificadas com 0,0100 mg/kg de cloratos	71
Tabela 9.32 - Análise dos resultados obtidos para a precisão intermédia das matrizes em estudo fortificadas com 0,0200 mg/kg (cereais) e 0,0300 mg/kg (frutos e vegetais) de cloratos	71
Tabela 9.33 - Controlo dos duplicados na matriz cenoura fortificada com 0,0100 e 0,0300 mg/kg de percloratos	73
Tabela 9.34 - Controlo dos duplicados na matriz cenoura fortificada com 0,0100 e 0,0300 mg/kg de cloratos	74
Tabela 9.35 - Análise dos resultados dos ensaios em duplicado das matrizes em estudo para os percloratos	75
Tabela 9.36 - Análise dos resultados dos ensaios em duplicado das matrizes em estudo para os cloratos	75
Tabela 9.37 - Análise dos resultados obtidos na quantificação das incertezas de medição na determinação de percloratos	76
Tabela 9.38 - Análise dos resultados obtidos na quantificação das incertezas de medição na determinação de cloratos	77
Tabela 9.39 - Concentrações obtidas de cloratos e percloratos (mg/kg) para as matrizes em estudo	78
Tabela 9.40 - Equações das retas efetuadas em matriz para a determinação dos percloratos e respetivos coeficientes de determinação (R^2)	78
Tabela 9.41 - Equações das retas efetuadas em matriz para a determinação dos cloratos e respetivos coeficientes de determinação (R^2)	79

Tabela 9.42 - Ensaios de recuperação com 0,0500, 0,100 e 0,500 mg/kg de percloratos nas amostras reais	79
Tabela 9.43 - Ensaios de recuperação com 0,0500,0,100 e 0,500 mg/kg de cloratos nas amostras reais	80
Tabela A1.1 - Análise das razões iônicas na determinação de percloratos na matriz arroz	91
Tabela A1.2 - Análise das razões iônicas na determinação de percloratos na matriz tomate	91
Tabela A1.3 - Análise dos resultados obtidos para as razões iônicas na determinação de percloratos das matrizes em estudo	91
Tabela A1.4 - Análise dos resultados obtidos para as razões iônicas na determinação de cloratos das matrizes em estudo	92
Tabela A2.1 - Padrões da reta de calibração em solvente dos cloratos e respectivas áreas dos picos cromatográficos na transição 85>69,2	94
Tabela A2.2 - Ensaios de recuperação com 0,0300 mg/kg de percloratos na Abóbora, determinados pela reta solvente	94
Tabela A2.3 - Ensaios de recuperação com 0,0300 mg/kg de cloratos no milho, determinados pela reta solvente	95
Tabela A2.4 - Padrões da reta de calibração em solvente e respectivas áreas dos picos cromatográficos na transição 83>67	95
Tabela A2.5 - Ensaios de recuperação com 0,0300 mg/kg de cloratos na cenoura, determinados pela reta solvente	95

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

α - Factor de seletividade

APCI - Ionização Química de Pressão Atmosférica

BEH - *Ethylene bridged hybrid*

CID - Dissociação induzida por colisão

ClO_3^- - Ião clorato

ClO_4^- - Ião perclorato

CONTAM- Painel sobre contaminantes na cadeia alimentar

CV - Coeficiente de variação

DC - Corrente continua

DPH's - Detergentes e Produtos de Higiene

EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

ESI - Ionização por *electrospray*

FE- Fase estacionária

Fe^{2+} - Ião ferro no estado ferroso

Fe^{3+} - Ião ferro no estado férrico

FM- Fase Móvel

FOG - Garantia Total de Execução

FT - Transformada de Fourier

GC - Cromatografia Gasosa

GPV - Válvula proporcional de gradiente

GSH - Glutathione

Hb - Hemoglobina

H_2O_2 - Peróxido de hidrogénio

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IS - Padrão interno

IT - Armadilha de iões

K - Fator de capacidade

KClO_4 - Perclorato de potássio

LC - Cromatografia Líquida

LC-ESI-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas tandem com Ionização por Electrospray

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa em tandem

LD - Limite de deteção

LLC - Cromatografia Líquido - Líquido

LMR- Limite Máximo de Resíduo

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

LQ - Limite de quantificação

LSC - Cromatografia Líquido - Sólido

M - Ião molecular

MHb - Metahemoglobina

MRM - Monitoramento múltiplo de reação

MS - Espectrometria de Massas

MS/MS - Espectrometria de Massa em tandem

NaClO₄ - Perclorato de sódio

NH₄ClO₄ - Perclorato de amónio

NIS - Simporte sódio e iodo

NMR - Espectrómetro de Ressonância Magnética Nuclear

NP - Fase Normal

PGC - Carbono grafite poroso

Q - Quadrupolo

QqQ - Triplo Quadropolo

QuPpe - *Quick Polar Pesticides*

R - Resolução

r - Coeficiente de correlação

RF - Radiofrequência

RP - Fase Reversa

SFC - Fluido supercrítico

SGS - Société Générale de Surveillance

TOF - Tempo de voo

TSP - Ionização por *termospray*

t_R - Tempo de Retenção

μ - Velocidade Linear

UE - União Europeia

UPLC - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

u - Incerteza expandida

u_c - Incerteza combinada

u_{prec} - Incerteza associada à precisão

UV - Ultravioleta

u_{ver} - Incerteza associada à exatidão

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Enquadramento

Os frutos e vegetais são alimentos fundamentais para uma dieta saudável, pela sua riqueza em vitaminas, minerais, fibras alimentares e fitoquímicos, necessários para o bom funcionamento do organismo. Para além disso o consumo destes alimentos tem sido associado à prevenção de diversas doenças, como é o caso de doenças cardiovasculares (Slavin & Lloyd, 2012). Outro alimento a ter em conta para a obtenção de uma dieta equilibrada são os cereais, que são constituídos por hidratos de carbono e em menor percentagem por proteínas e fibras alimentares, sendo um dos grupos alimentares mais consumidos a nível mundial (Laskowski *et al.*, 2019).

No entanto, os frutos, vegetais e cereais são facilmente contaminados por contaminantes químicos nas diferentes etapas da cadeia alimentar (produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização) podendo ser um risco para a saúde do consumidor (CDC, 2017a).

Os cloratos e os percloratos, nos últimos anos, têm sido alvo de estudo por diversos investigadores, tornando-se um tema de interesse crescente a nível mundial, devido a estes iões serem associados a inúmeros efeitos negativos na saúde, como a inibição da captação de iodo por parte da tiroide, resultando em hipotireoidismo (EFSA, 2015a).

Apesar dos cloratos não estarem autorizados como pesticidas na União Europeia (UE) desde 2008, de acordo com a Decisão 2008/865/CE da comissão Europeia, estes continuam a ser um contaminante de águas e alimentos, especialmente frutos e vegetais. Isto deve-se ao facto dos cloratos serem um subproduto dos compostos clorados, com características bactericidas, utilizados para a desinfecção de águas para consumo humano e águas utilizadas na lavagem de alimentos (EFSA, 2015b).

À semelhança do clorato, o perclorato também tem uma molécula de cloro na sua constituição e é frequentemente encontrado nos solos, águas subterrâneas e superficiais, principalmente na forma de perclorato de potássio, sódio e amónio. Pode ocorrer naturalmente no ambiente ou ser formado a partir de fontes antropogénicas, podendo contaminar os frutos e vegetais (Srinivasan & Viraraghavan, 2009).

Apesar de não estarem definidos limites máximos de cloratos e percloratos nos alimentos na União Europeia e apenas existirem limites de referência, é essencial haver um controlo da concentração destes micropoluentes, de forma a regular a sua presença nos alimentos, com o objetivo de proteger a saúde dos consumidores (EFSA, 2015a).

Assim, esta dissertação tem como objetivo a implementação e validação de um método analítico para a determinação de cloratos e percloratos em frutos, vegetais e cereais. Foi utilizada a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* com ionização por *electrospray* (LC-ESI-MS/MS), por ser uma técnica sensível, rápida e robusta para a quantificação e qualificação destes contaminantes químicos em alimentos (Kamoshita *et al.*, 2009).

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

1. Société Générale de Surveillance (SGS)

1.1 A Empresa

A SGS é uma empresa líder mundial em inspeção, verificação, testes e certificação (Figura 1.1). Reconhecida como referência global em qualidade e integridade, sendo que na atualidade conta com mais de 97.000 funcionários e opera uma rede de mais de 2.600 escritórios e laboratórios em todo o mundo (SGS, 2019a).



Figura 1.1- Logótipo da SGS (SGS, 2017a)

1.2 História

Fundada a 12 de Dezembro de 1878, em Rouen, França, por Henri Goldstuck, a SGS transformou o comércio de grãos na Europa, oferecendo aos seus clientes serviços inovadores de inspeção agrícola. Uma das primeiras inovações que ajudaram a empresa a construir a sua reputação foi o serviço denominado por Garantia Total de Execução (FOG), que consiste na inspeção no local de carga e descarga de grãos, existindo assim a possibilidade de o exportador ser reembolsado no caso de perda, durante o transporte. É um serviço ainda fornecido pela SGS na atualidade (SGS, 2019b).

Em 1915, durante a primeira Guerra Mundial, a sede da empresa passou de Paris a Genebra, na Suíça, devido ao facto de este ser considerado um país neutro. A 19 de julho de 1919, a empresa deu mais um passo na sua reconstrução e adotou o nome que hoje apresenta, Société Générale de Surveillance (SGS, 2019b).

A segunda Guerra Mundial (1939-1945), trouxe graves problemas para o comércio global, afetando o setor de inspeção da empresa, contudo, a SGS por meio de contratos realizados com as forças aliadas, passou a inspecionar os bens de consumo que entravam na Europa, destinados a soldados, permitindo assim a retoma dos seus lucros (SGS, 2019b).

Em 1950, 80% dos lucros da empresa ainda provinham de seu principal negócio de serviços agrícolas, mas para sobreviver a longo prazo a administração decidiu expandir a sua área de negócios. Assim em 1955 a SGS começou o negócio de serviços industriais, com a inspeção de máquinas e bens industriais. Entre 1955 e 1965 foram adquiridas várias empresas líderes em

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

testes petrolíferos e petroquímicos, expandido a sua área de negócio de Serviços de FOG na área da indústria mineral (SGS, 2019b).

Na década de 70 com o aumento das preocupações ambientais causadas pela indústria, a SGS começou a fornecer consultoria ambiental e serviços de remediação para clientes do setor petrolífero. A demanda por serviços ambientais logo se espalhou para outros setores de negócio, e no final da década de 80 foram criadas as linhas de negócio intituladas por serviços de ciências da vida e certificação de sistemas e serviços (SGS, 2019b).

As mudanças na indústria no setor de inspeções pré-embarque no final da década de 90 levaram a empresa a concentrar o seu segmento de serviços governamentais e institucionais em fontes de negócios mais estáveis. No início do novo milénio, uma ampla reestruturação corporativa levou à formação dos onze segmentos de negócios atualmente encontrados na SGS (agricultura e alimentação, construção, energia, indústria química, bens de consumo e retalho, industrial, ciências biológicas, petróleo e gás, indústria mineira/mineração, setor público e transporte). A empresa tem crescido constantemente para se tornar o líder que é hoje, por meio de melhoria contínua e inovação, reduzindo riscos e ao melhorar a produtividade e a eficiência das operações dos seus clientes (SGS, 2019b).

1.3 SGS em Portugal

Atualmente a SGS Portugal conta já com mais de 300 colaboradores diretos (e cerca de 200 indiretos) e uma extensa bolsa de especialistas externos com total cobertura geográfica nacional (Continente e Ilhas) (SGS, 2019c).

Originalmente, a SGS dedicava-se ao controlo de operações das cargas e descargas de cereais a granel. Devido às exigências e mudanças do mercado a SGS Portugal foi alargando sustentadamente a sua atividade a outros setores, estendendo-se aos mais diversos setores da atividade económica disponibilizando um vasto portfólio de serviços nas áreas da inspeção, verificação, ensaios e testes laboratoriais, consultoria e certificação (SGS, 2019c).

1.3.1 Laboratórios da SGS Portugal

A SGS Portugal possui laboratórios acreditados nas áreas: Alimentar (frescos, processados, alimentação animal), ambiental (ar, águas), DPH's (Detergentes e Produtos de Higiene) e dispositivos médicos, produtos químicos e petrolíferos (SGS, 2019c).

1.4 Serviços

Os seus serviços podem ser divididos em quatro categorias (SGS, 2019a):

- Inspeção: Que conta com uma abrangente gama de serviços com o objetivo de controlar a quantidade e qualidade, considerando todos os requisitos regulatórios em diversas regiões e mercados;
- Testes: Com o intuito de reduzir riscos e tempo de comercialização dos produtos, a SGS é composta por uma abrangente rede global de instalações de testes, constituída por pessoal qualificado e experiente;
- Certificação: A SGS permite demonstrar através de auditorias que os produtos, processos, sistemas ou serviços dos seus clientes estão em conformidade com os padrões e regulamentos nacionais, internacionais ou padrões definidos pelo cliente;
- Verificação: Composta por uma extensa gama de setores a SGS especializa-se em garantir que os produtos e serviços do seu cliente cumprem os padrões locais e globais, cobrindo toda a cadeia de distribuição desde as matérias-primas até ao consumo final (SGS, 2019a).

No setor agroalimentar a SGS oferece serviços digitais, tradicionais e modernos, para produtos agroquímicos, sementes, biocombustíveis, fertilizantes, alimentos e para a indústria florestal, que reduzem riscos e mantêm a eficiência em diversas cadeias agrícolas e de fornecimento de alimentos. Ao utilizar a tecnologia mais recente a SGS permite aumentar a eficiência e ajudar os clientes a trabalhar de forma mais produtiva. Da produção primária ao consumo, a empresa oferece o seu serviço na verificação do armazenamento, transporte, embalagem e distribuição de produtos, assim como na inspeção de produtos para importação e exportação, assegurando a integridade dos seus clientes, ao avaliar a qualidade dos seus produtos, permitindo um fornecimento seguro e sustentável (SGS, 2019d).

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

2. Percloratos e Cloratos

2.1 Percloratos

O perclorato é um anião quimicamente estável, com peso molecular de 99,45 g/mol, que consiste em um átomo de cloro ligado a quatro átomos de oxigénio em uma geometria tetraédrica (ClO_4^-) (Figura 2.1). O átomo de cloro encontra-se no estado de oxidação + 7, o estado de oxidação mais elevado deste elemento, tornando o perclorato um forte agente oxidante. Contudo a redução do perclorato é extremamente lenta devida à alta energia de ativação (EFSA, 2015a).

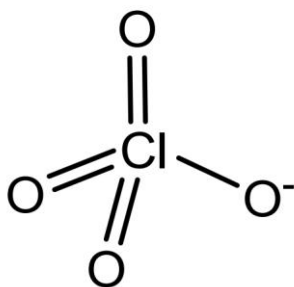


Figura 2.1: Estrutura química do ião perclorato (EFSA, 2015a)

O perclorato é normalmente encontrado como o componente aniónico de um sal frequentemente associado a catiões como o amónio, sódio ou potássio dando origem ao perclorato de amónio (NH_4ClO_4), perclorato de sódio (NaClO_4), e perclorato de potássio, (KClO_4), respetivamente (Srinivasan & Viraraghavan, 2009). Com uma menor frequência, o perclorato também pode ser encontrado na forma de perclorato de alumínio, perclorato de lítio, perclorato de magnésio e ácido perclórico (EPA, 2008).

Os principais sais inorgânicos deste anião são incolores e não têm odor. Estes têm baixa pressão de vapor, não conseguindo volatilizar sob condições ambientais e são extremamente solúveis em água. Essa elevada solubilidade e a fraca adsorção aos minerais típicos do solo e carbono orgânico tornam este anião altamente móvel no ambiente, especialmente em águas de superfície e subterrâneas (Brown & Gu, 2006).

2.1.1 Fontes de contaminação de percloratos

O perclorato é um contaminante químico omnipresente que é libertado para o ambiente a partir de fontes naturais e antropogénicas, e dessa forma pode contaminar os alimentos e água potável (EPA, 2014).

A presença de percloratos no solo e na água subterrânea é uma via importante para a presença de percloratos em vegetais, devido à sua rápida absorção através das raízes das plantas. As plantas que crescem em solos contaminados ou que são regadas com água contaminada podem acumular percloratos principalmente no tecido foliar (EFSA, 2015a). No entanto, diferentes fatores como a espécie, maturidade da planta, disponibilidade de outros nutrientes e iões no meio e a eficiência do processo de transpiração podem influenciar a absorção de percloratos nas plantas (Kumarathilaka *et al.*, 2016).

Existem vários processos naturais que levam à formação de percloratos, incluindo, as reações fotoquímicas entre o cloro inorgânico e o ozono, a foto-oxidação mediada pelos raios ultravioletas, e a conversão de espécies de cloro orgânico, como o cloreto de metila. Além disso, também pode ocorrer deposição atmosférica a longo prazo, principalmente em regiões áridas e semiáridas, como é o caso do deserto do Atacama, conhecido como a região mais árida do mundo (Cao *et al.*, 2019).

A formação de percloratos durante a degradação de produtos cloratos, como o hipoclorito de sódio usado na desinfecção das águas é outra fonte notável de contaminação. Para além disso, o perclorato é um componente de fertilizantes de origem natural, como é o caso dos nitratos chilenos (EFSA, 2017).

Os percloratos são estáveis a temperaturas controladas, no entanto estes quando são expostos a uma temperatura elevada começam a reagir, produzindo uma grande quantidade de calor. Isso faz com que mais moléculas de percloratos comecem a reagir o que aumenta ainda mais o calor. Este processo de reação em cadeia repete-se até ocorrer uma explosão. Devido à sua capacidade oxidante excecional, o perclorato é amplamente utilizado pela indústria no fabrico de munições, explosivos, mísseis e fogos-de-artifício, especialmente o perclorato de amónio (NH_4ClO_4). Também é utilizado em *airbags* de automóveis e noutras aplicações em que é necessário um oxidante energético (ATSDR, 2008).

Existe uma ampla variedade de técnicas físico-químicas e biológicas que permitem a remoção do perclorato em ambientes contaminados, tais como redução química, redução biológica, adsorção, filtração por membranas, troca iónica e redução eletromagnética. Os métodos de tratamento biológico são uma solução ecológica e eficiente, e são os mais indicados para a diminuição dos níveis de perclorato nas plantas. Enquanto que as resinas de troca iónica são as mais eficientes para a eliminação de perclorato presente em níveis inferiores a 50 mg/L em água (Kumarathilaka *et al.*, 2016).

2.1.2 Exposição aos percloratos

As principais fontes de exposição aos percloratos são a ingestão de água e leite contaminados e o consumo de vegetais com alto teor de água (exemplo alface), no caso de estes terem absorvido água contaminada com percloratos. Num ambiente ocupacional as pessoas podem estar expostas a maiores quantidades de percloratos do que a população em geral, apesar de ser pouco provável que estes iões volatizem para o ar durante o processo de fabrico, processamento ou transporte (CDC, 2017b).

Após o consumo de alimentos ou água contendo percloratos, estes aniões devido à sua facilidade em se dissolver em água percorrem rapidamente o trato gastrointestinal e entram na corrente sanguínea. A inalação é outra forma de exposição aos percloratos, que passam pelos pulmões e entram na corrente sanguínea. Não existem evidências que os percloratos sejam absorvidos pela pele (ATSDR, 2008).

O perclorato após entrar na corrente sanguínea é amplamente distribuído no organismo sendo em concentrações mais elevadas na tiroide e é rapidamente excretado, principalmente na urina como composto original inalterado, tendo uma semi-vida em humanos de cerca de 6 a 8h (Srinivasan & Viraraghavan, 2009).

Em doses suficientemente altas o perclorato inibe a retenção de iodo pela glândula tiroide, uma vez que atua como um inibidor competitivo da absorção de iodo pelo simporte de sódio e iodo (NIS), localizado na membrana basolateral das células foliculares da tiroide. O ião perclorato é então transportado para o lúmen da tiroide antes de se disseminar passivamente para fora da glândula tiroide e ser subsequentemente eliminado pela urina. A captação de iodo por parte da tiroide é muito importante para a síntese de hormonas da tiroide: triiodotironina (T3) e a tiroxina (T4). A inibição grave e sustentada da captação de iodo na tiroide após a exposição ao perclorato pode limitar a disponibilidade de iodo necessária para a produção dessas hormonas, resultando em hipotireoidismo, o que provoca uma redução na atividade metabólica na maioria dos tecidos (Pleus & Corey, 2018).

O Painel da EFSA sobre Contaminantes na Cadeia Alimentar (CONTAM), em 2015 concluiu que a inibição sustentada da captação de iodo por parte da tiroide resultante da exposição crónica ao perclorato pode provocar efeitos a longo prazo como o desenvolvimento de bócio multinodular tóxico, em particular, em populações com deficiência leve e moderada de iodo. Segundo o CONTAM, uma única exposição alimentar aguda aos percloratos é improvável que cause efeitos adversos na saúde (EFSA, 2017).

No caso dos fetos, bebês e crianças pequenas as hormonas da tiroide são essenciais para o seu desenvolvimento e crescimento normal, dessa forma a interrupção da absorção de iodo apresenta riscos específicos na saúde podendo ocorrer mudanças irreversíveis. Durante o primeiro trimestre de gravidez o feto depende de um nível adequado de hormonas tiroideias maternas para o desenvolvimento do sistema nervoso central, assim a inibição da captação de iodo no organismo materno pela exposição aos percloratos pode comprometer o desenvolvimento neuronal do feto. A má absorção de iodo em mulheres grávidas e lactantes tem sido associada ao atraso do desenvolvimento e à diminuição da capacidade de aprendizagem em bebês e crianças (EPA, 2008).

A exposição a curto prazo a altas doses de percloratos de amónio, sódio ou potássio pode causar irritação nos olhos, pele e trato respiratório, tosse, náuseas, vômitos e diarreia. O ácido perclórico é corrosivo para os olhos, pele e trato respiratório, e a exposição de curto prazo a altas doses pode causar dor de garganta, tosse, dificuldades respiratórias, queimaduras profundas, perda de visão, dor abdominal, vômitos e diarreia (EPA, 2014).

2.2 Cloratos

O Clorato é um anião, com um peso molecular de 83,45 g/mol, formado por um átomo de cloro num estado de oxidação +5 ligado a três átomos de oxigénio (ClO_3^-), numa estrutura piramidal trigonal (Figura 2.2). Uma vez que todas as suas ligações Cl-O são do mesmo comprimento e o átomo de cloro é hipervalente, este anião é considerado um híbrido de ressonância (EFSA, 2015b).

O anião clorato é um poderoso oxidante e pode formar diversos sais, com cristais incolores ou brancos, tais como o clorato de sódio, clorato de potássio, clorato de cálcio e o clorato de magnésio. Contudo é encontrado com uma maior frequência na forma de clorato de sódio (EPA, 2016).

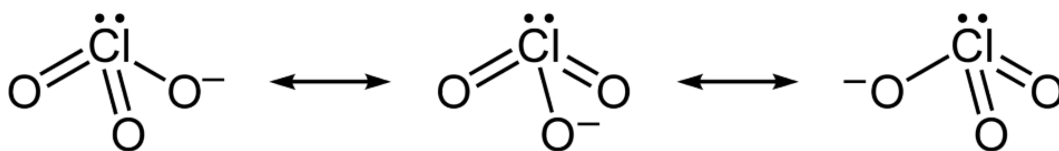


Figura 2.2: Estruturas de ressonância de cloratos (EFSA, 2015b).

Os sais de clorato são extremamente solúveis em água, no entanto na maioria das condições ambientais o clorato sofre reações de redução e oxidação. Como o clorato é um forte

agente oxidante este é tipicamente reduzido a espécies de cloro em estados de oxidação mais baixos, como é o caso do cloreto. Através de oxidações redox extensas ocorre a redução de cloratos na água (EPA, 2016).

Existem vários fatores que afetam as reações redox no solo e na água, tais como a temperatura, o pH, a concentração de clorato, a natureza e a concentração dos agentes redutores e o grau de humidade nos solos. As condições alcalinas favorecem a estabilidade dos cloratos (EPA, 2016).

2.2.1 Fontes de contaminação de Cloratos

Os compostos contendo cloro, como é o caso dos cloratos, possuem propriedades bactericidas e oxidativas e, portanto, são comumente utilizados em práticas agrícolas, tratamento de águas e processos industriais de fabrico de alimentos. O cloro como agente desinfetante desempenha um papel crucial na produção de alimentos, no entanto a formação de subprodutos, como os cloratos, tem sido uma preocupação para as indústrias do setor alimentar e para os órgãos reguladores, como é o caso da EFSA (McCarthy *et al.*, 2018).

O clorato é formado como um subproduto por consequência da utilização do cloro, dióxido de cloro ou hipoclorito na desinfecção da água potável ou água utilizada na produção de alimentos, especialmente em linhas de produção em que a água de lavagem é reciclada e a desinfecção com cloro é usada para manter a qualidade microbiológica da água a um nível aceitável, concentrando-se dessa forma resíduos de cloratos nos alimentos (Gil *et al.*, 2016).

Para além disso as superfícies e equipamentos dos processos de produção são limpos e desinfetados com detergentes clorados, antes da sua utilização, contribuindo para a contaminação de cloratos nos alimentos (EFSA, 2015b).

Os frutos e vegetais são frequentemente lavados com água contendo produtos químicos à base de cloro, de forma a serem removidos os resíduos dos campos agrícolas, antes da sua distribuição para o consumidor final. Quanto maior for a relação superfície/volume dos vegetais e frutos, como por exemplo os vegetais folhosos, maior será a exposição de tecido comestível ao desinfetante, e dessa forma maior será a quantidade de cloratos acumulados (FAO, 2009).

A maioria do clorato comercial encontra-se na forma de clorato de sódio, no qual cerca de 95% é utilizado no fabrico de produtos químicos (como o dióxido de cloro), usados para o processo de branqueamento em indústrias de celulose e papel. O restante é utilizado na agricultura como herbicida, no fabrico de cloretos e clorato de potássio, na mineração hidráulica de urânio e na produção de percloratos utilizados na pirotecnia e no fabrico de fósforos (EPA, 2016).

Os cloratos são fortes oxidantes com atividade herbicida e biocida, no entanto já não são aprovados como pesticidas na União Europeia desde 2008 de acordo com a Decisão 2008/865/CE da comissão Europeia. O uso de biocidas com clorato de sódio também não é permitido na União Europeia (EFSA, 2015b).

2.2.2 Exposição aos cloratos

Após a ingestão de alimentos ou água contaminados com cloratos, este é rapidamente absorvido e distribuído por todo o organismo e é excretado principalmente na urina sob a forma de cloreto, e em menores quantidades sob a forma de clorito e clorato (FAO, 2009).

Os cloratos presentes no organismo entram nas células por difusão simples ou através de canais iónicos presentes na membrana celular, podendo provocar stress oxidativo. O organismo possui vários mecanismos antioxidantes para proteger as células desse processo, sendo o mais importante o ciclo redox da glutatona (GSH). Contudo quando o stress oxidativo é muito elevado, estes mecanismos de defesa podem ser superados causando danos substanciais às células. As células sanguíneas representam um dos principais alvos destes tóxicos, ocorrendo a oxidação da hemoglobina (Hb) em meta-hemoglobina (MHb) resultando na formação de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radicais livres que podem danificar proteínas e lípidos celulares. Para além disso, o H_2O_2 formado pode originar produtos de degradação do hemo que se ligam a lípidos e proteínas da membrana afetando a estrutura membranar e dessa forma pode provocar a hemólise intravascular (Bathina *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2016).

A meta-hemoglobina é formada quando ocorre a oxidação do ferro da desoxihemoglobina do estado ferroso (Fe^{2+}) para o estado férrico (Fe^{3+}), dificultando o transporte das moléculas de oxigénio, devido à sua baixa capacidade de se ligar de forma reversível ao oxigénio, provocando hipóxia nos tecidos e acidose metabólica. Para além disso a meta-hemoglobina induz a libertação de interleucina-6, interleucina-8 e E-selectina que estimulam a libertação de citocinas e moléculas de adesão aumentando a resposta inflamatória. Em caso de exposição crónica pode dar origem a uma lesão renal aguda e insuficiência renal (McCarthy *et al.*, 2018).

O clorato é quimicamente semelhante ao perclorato que é um agente tóxico das glândulas da tiroide, dessa forma o clorato também inibe o transporte ativo de iodo a partir do sangue para as células foliculares da tiroide através do simporte sódio e iodo (NIS). Contudo, o perclorato apresenta uma maior afinidade de absorção pelo NIS do que o clorato, devido às suas semelhanças de raio iónico e carga com a molécula de iodeto (McCarthy *et al.*, 2018).

De acordo com a EFSA, o ião clorato é de alta toxicidade aguda em seres humanos, ocorrendo uma toxicidade a partir de doses orais de 11 a 23 mg de clorato/kg de peso corporal. A letalidade é relatada a partir de 50 mg de clorato/kg de peso corporal. O efeito agudo crítico em humanos, identificado em casos de envenenamento, é a indução de metemoglobinemia, seguida pela lise dos eritrócitos que podem causar eventualmente uma deficiência renal (EFSA, 2015b).

2.3 Legislação

Não estão estabelecidos limites máximos de percloratos nos alimentos na União Europeia. Foi realizada uma abordagem de execução provisória que foi aprovada pelo Comité Permanente da CE da Cadeia Alimentar e da Saúde animal em 2013, de forma a conceder proteção à saúde dos consumidores, tendo em conta as boas práticas e as diferenças regionais. Esses valores de referência foram revistos em 2015 (EFSA, 2015a).

A tabela 2.1 mostra os valores de referência dos percloratos, em diferentes géneros alimentícios, que foram estabelecidos em 2015.

No caso dos cloratos também não foram estabelecidos teores máximos de resíduos específicos (LMR) pela União Europeia. Por conseguinte, um LMR por defeito de 0,01 mg/kg é aplicável a todos os géneros alimentícios, de acordo com o Regulamento (CE) n.º 396/2005 (EFSA, 2015b).

Tabela 2.1: Níveis de perclorato como referência para o comércio na EU

Alimentos^(a)	(mg/kg)
Frutos e produtos Hortícolas à exceção de:	0,1
-Cucurbitáceas e produtos hortícolas de folhas, com exceção de:	0,2
-Aipo e espinafre cultivados em estufa / disfarçado	0,5
-Ervas, alface e salada, incluindo rúcula, cultivada em estufa / sob cobertura	1,0
Especiarias secas (exceto ervas secas e paprica), lúpulo seco	0,5
Chá (<i>Camellia sinensis</i>), seco	0,75
Infusões de ervas e frutos, secos	1,0
Alimentos para bebés e crianças pequenas - prontos a comer	0,02
Outros alimentos	0,05

(a): os níveis como valores de referência para o comércio na UE aplicam-se, na medida em que não sejam especificados, aos alimentos não transformados. Para os géneros alimentícios secos, diluídos, transformados e compostos, é aplicável o artigo 2.º do Regulamento (CE) n.º 1831/2003.

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

3. Método analítico para a determinação de percloratos e cloratos

Os métodos analíticos para a quantificação de cloratos e percloratos em alimento são tipicamente baseados em técnicas espectrofotométricas ou colorimétricas, eletroquímicas e cromatográficas, especialmente cromatografia acoplada à espectrometria de massas (EFSA, 2015b).

A Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem* com ionização por *electrospray* (LC-ESI-MS/MS) é uma técnica sensível, rápida e robusta para a quantificação e qualificação de contaminantes químicos em águas e alimentos. Esta técnica é capaz de detetar simultaneamente cloratos, percloratos e/ou outros contaminantes numa única análise (Constantinou *et al.*, 2019).

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

4. Cromatografia

A cromatografia é uma importante técnica biofísica inventada pelo botânico Mikhail Tswett no início do século XX, que veio permitir a separação, identificação e purificação dos componentes de uma mistura complexa para análise qualitativa e quantitativa. Nesta técnica a amostra que se pretende analisar é dissolvida num fluido, fase móvel, que a transporta através de outra estrutura contendo outro material, fase estacionária, que está fixa numa coluna (Coskun, 2016). Os compostos da amostra têm afinidades diferentes com a fase estacionária. Quando a força de interação entre o composto e a fase estacionária é forte, este será fortemente retido na coluna, tendo uma mobilidade menor na fase móvel. Por outro lado, os compostos da amostra que apresentam pouca afinidade com a fase estacionária, terão maior mobilidade na fase móvel. Desta forma os vários constituintes da amostra circulam a velocidades diferentes ocorrendo a sua separação. A separação é baseada nas propriedades moleculares dos compostos, como o tamanho ou a polaridade (Nagy & Vékey, 2008; Coskun, 2016).

4.1 Teoria da cromatografia

O termo cromatografia engloba uma ampla diversidade de técnicas de separação baseadas na partição ou distribuição de um soluto entre a fase móvel e estacionária. A fase móvel pode ser um gás, no caso da cromatografia gasosa (GC), um líquido, no caso da cromatografia líquida (LC) ou um fluido supercrítico (SFC). A fase estacionária pode ser um líquido ou, mais usualmente, um sólido (Ismail & Nielsen, 2010).

À medida que os compostos são separados e detetados vão dar origem a uma série de sinais em função do tempo que são representados graficamente sob a forma de um cromatograma. Cada um dos sinais representa a distribuição de um componente eluído na fase móvel (Braithwaite & Smith, 1999).

Entre os vários parâmetros que caracterizam os cromatogramas, os mais importantes são o tempo de retenção, a resolução e a intensidade do sinal (Nagy & Vékey, 2008).

4.1.1 Tempo de retenção

O tempo de retenção (t_R) de um composto é o tempo que decorre desde a sua injeção no sistema até ao momento que é detetado. Este é característico para um dado composto desde que as condições cromatográficas permaneçam inalteradas (coluna, fase móvel, temperatura, etc.). O tempo de retenção está fortemente correlacionado com as propriedades físico-químicas de um analito fornecendo informações qualitativas (Nagy & Vékey, 2008). Dois componentes só serão

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

separados se forem retidos na fase estacionária em momentos diferentes, ou seja se apresentarem t_R diferentes. Este pode ser determinado segundo a equação:

$$t_R = t_R' + t_m$$

Onde o t_R' é o tempo de retenção ajustado ou tempo na fase estacionária e o t_m é o tempo morto, ou seja o tempo que a espécie demora a atravessar a coluna sem ter interação com a fase estacionária, também designado de tempo de retardo da fase móvel ou tempo nulo (Braithwaite & Smith, 1999).

4.1.2 Fator de capacidade

O fator de capacidade ou fator de retenção (k) é independente do equipamento e é uma medida de distribuição de um dado composto entre a fase móvel e a fase estacionária. Esta medida indica a capacidade da coluna em reter um composto da amostra e relaciona o tempo em que o analito permanece na fase estacionária com o tempo morto (Weiss, 2016).

Valores de k muito pequenos indicam uma separação fraca. Por outro lado, quando os valores de k são muito elevados, significa tempos de corrida muito longos e consequentemente perda de sensibilidade por alargamento do pico (Weiss, 2016).

Duas substâncias só serão adequadamente separadas se tiverem fatores de capacidade diferentes (Eith *et al.*, 2007).

O k pode ser calculado segundo (Braithwaite & Smith, 1999)

$$k = \frac{t_R'}{t_m}$$

4.1.3 Seletividade

A seletividade é um parâmetro decisivo na análise da separação de dois compostos. O fator de seletividade, α , é usado para descrever a retenção relativa de dois compostos em uma determinada fase estacionária (Braithwaite & Smith, 1999). Este pode ser definido de acordo com a equação:

$$\alpha = \frac{t_{R2}'}{t_{R1}'} = \frac{k_2}{k_1} \quad k_2 > k_1$$

Onde o k_2 é o fator de capacidade do composto com maior retenção, o k_1 é o fator de capacidade

do composto menos retido. Quanto maior o valor de α melhor será a separação cromatográfica (Eith *et al.*, 2007).

4.1.4 Resolução

A resolução (R) é um parâmetro muito importante numa análise cromatográfica pois representa uma medida da qualidade da separação entre dois picos consecutivos no cromatograma. A resolução pode ser calculada a partir da equação (Skoog *et al.*, 2014)

$$R = \frac{t_{R1} - t_{R2}}{\frac{1}{2} (w_1 + w_2)} = \frac{2\Delta t_R}{w_1 + w_2}$$

Onde t_{R1} e t_{R2} são o tempo de retenção do primeiro e segundo composto, e o w_1 e w_2 são as larguras (na linha de base) do pico do primeiro e segundo composto, respetivamente.

Uma boa resolução dos compostos é fundamental para as análises quantitativas. Se a resolução entre dois compostos for boa, estes serão totalmente separados e chegaram ao detetor em momentos diferentes, sem interferirem um com o outro (Eith *et al.*, 2007).

Se a diferença entre os tempos de retenção de dois picos for grande, em relação às suas larguras, então a resolução cromatográfica é boa. Quando se obtém valores de $R = 0,5$, os picos podem ser considerados separados, mas não resolvidos. Para análises quantitativas o R deve estar entre 1,2 e 1,5, valores de $R \geq 2$ resultam em análises excessivamente demoradas (Eith *et al.*, 2007).

4.1.5 Eficiência da coluna

Uma desvantagem da cromatografia é o alargamento do pico cromatográfico causado por processos de difusão e de fluxo. A eficiência de uma coluna cromatográfica é dada pelo número de pratos teóricos (N), que pode ser determinado diretamente no cromatograma usando a variância (σ), a largura do pico na linha de base (w_b) ou a largura do pico a meia altura ($W_{0,5}$) e são obtidos pela equação (Eith *et al.*, 2007)

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 8 \ln(2) \left(\frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2 = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2$$

Quanto maior o número de pratos teóricos menor é a largura das bandas obtendo-se uma melhor separação dos picos cromatográficos. Para caracterizar e comparar o desempenho de diferentes fases estacionárias utiliza-se frequentemente a razão entre o número de placas e 1 metro (número teórico de placas para uma coluna com 1 metro de comprimento) (Nagy & Vékey, 2008).

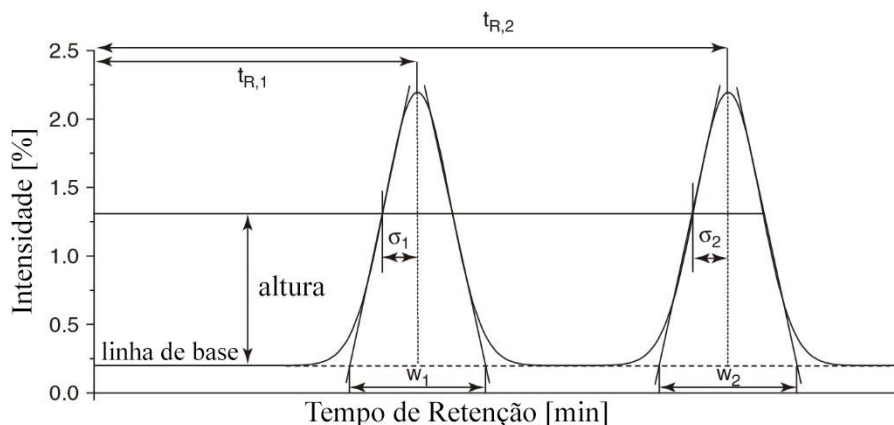


Figura 4.1: Cromatograma com os parâmetros para a caracterização dos picos cromatográficos (adaptado de: Nagy & Vékey 2008).

4.2 Cromatografia Líquida (LC)

O processo em cromatografia líquida (LC) é o resultado das múltiplas interações entre um analito, uma fase estacionária, e uma fase móvel. De acordo com o estado físico da fase estacionária, o LC é subdividido em cromatografia líquido-líquido (LLC) e em cromatografia líquido-sólido (LSC). Ambos os métodos podem ser usados no modo de fase normal (NP) e em fase reversa (RP), dependendo da polaridade relativa de ambas as fases (Niessen, 2006).

Uma fase estacionária adequada para LC deve satisfazer vários requisitos, tais como, ser insolúvel na fase móvel, ter uma área de superfície bem desenvolvida e não interagir irreversivelmente com o analito (Nesterenko & Palamareva, 2018).

A maioria das aplicações de LC é efetuada com separação reversa, isto é, com uma fase estacionária não polar e uma fase móvel polar, sendo ideal para a análise de analitos polares e iônicos (Niessen, 2006).

De forma a obter uma maior eficiência na separação dos compostos, desenvolveu-se uma nova técnica de cromatografia líquida, a cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC). Esta técnica assenta nos princípios da cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), mas com algumas diferenças que vão facilitar o método de separação (Maldaner & Jardim, 2009).

Neste trabalho prático foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) acoplada a espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS).

4.3 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

O primeiro equipamento de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) foi lançado pela Waters Corporation em 2004, denominado ACQUITY UPLC® System, e desde então tem sido utilizado a nível mundial em vários campos de aplicação, como na indústria farmacêutica, alimentícia, ambiental, forense, toxicológica e de pesticidas. A técnica de UPLC pode estar acoplada a outras técnicas tais como espectrómetro de massa (MS), cromatógrafo de iões (IC), espectrómetro de ressonância magnética nuclear (NMR), espectrómetro de infravermelhos, etc (Hussain & Shaikh, 2016).

O princípio da cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) consiste no mesmo princípio cromatográfico da cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), mas com algumas diferenças que vieram facilitar o método de separação, permitindo o aumento da resolução, eficiência e rapidez da cromatografia líquida. O desenvolvimento da técnica de UPLC consiste na aplicação de pressões mais elevadas, na faixa de 400 a 1000 bar, na utilização de uma fase estacionária (FE) composta por partículas porosas de dimensões iguais ou inferiores a 2 µm (enquanto as colunas de HPLC são tipicamente constituídas por partículas de tamanho entre 3 e 5 µm) proporcionando um aumento de resolução, juntamente com altas velocidades lineares da fase móvel (FM), permitindo a diminuição do tamanho da coluna, o que reduz o consumo de solvente e economiza o tempo de análise (Sidsdhan, 2018).

O princípio subjacente a esta evolução tem como base a equação de *Van Deemter*, que é uma fórmula empírica que descreve a relação entre a altura do prato teórico (H), a velocidade linear da fase móvel (µ) e o tamanho da partícula da fase estacionária (dp) (Cielecka-Piontek *et al.*, 2013).

$$H = A d_p + \frac{B D_M}{\mu} + \frac{C d_p^2}{D_M}$$

Onde, A, B e C são constantes e o DM o coeficiente de difusão do analito.

O termo A é independente da velocidade e representa o coeficiente de difusão de “Eddy”. Este é menor quando as partículas da fase estacionária são pequenas e uniformes. A constante B representa a difusão axial ou a tendência de difusão natural das moléculas. O B depende da velocidade linear e o seu valor é menor quando existem altas taxas de fluxo. O termo C representa a resistência de transferência de massa, ou seja, o movimento do analito ou a transferência da sua massa entre a fase móvel e estacionária e é proporcional à velocidade linear (Patil, 2015).

No entanto, a técnica de UPLC tem como desvantagens, a alta pressão de retorno que reduz a vida útil da coluna e o facto de fases estacionárias com partículas inferiores a 2 µm, normalmente não serem regeneráveis (Maldaner & Jardim, 2012).

4.4 Sistema UPLC

O sistema de UPLC possui um sistema binário ou quaternário de solventes, o sistema de injeção da amostra, a coluna cromatográfica e respetiva fase estacionária e a bomba (Hussain, 2010).

4.4.1 Bomba

Na técnica de UPLC a bomba é considerada um dos componentes mais importantes e deve fornecer um fluxo constante contínuo do eluente através do injetor, coluna e detetor (Reddy, 2012).

A bomba mistura os solventes em proporção constante (isocrática) ou em proporção variável (gradiente). O bombeamento isocrático consiste na pressão exercida por um gás sobre um pistão de secção transversal, que por sua vez exerce pressão diretamente num pistão de secção transversal de menor dimensão, que exerce pressão sobre um líquido. Estas bombas são de pressão constante, e não de fluxo constante, no entanto, se a coluna fornecer uma resistência constante ao fluxo, pode-se alcançar um fluxo constante (Jorgenson, 2010).

No modo gradiente, a bomba altera gradualmente a proporção do segundo componente da fase móvel, designado eluente B, de uma percentagem mais baixa para uma percentagem maior. Ao primeiro componente da fase móvel chamamos de eluente A, este tem uma menor resistência à eluição que o eluente B (Agilent Technologies, 2016).

No bombeamento por gradiente de eluição existem dois tipos de sistemas de mistura de solventes: em alta pressão e em baixa pressão. Em alta pressão a mistura dos solventes é realizada por um sistema multi-bomba, ou seja ocorre a operação de um par de bombas em conjunto, de forma a produzir gradientes binários. Neste sistema a mistura de solventes ocorre após a bomba, e geralmente estes sofrem alguma expansão ou contração. A pressão de operação depende das dimensões da coluna, do tamanho de partículas da fase estacionária, do caudal e da composição da fase móvel (Sidsdhan, 2018). As bombas individuais, em série, são capazes de impulsionar a fase móvel através da coluna a um caudal específico, ao proporcionar elevadas pressões. À saída de cada bomba, existe um filtro e um misturador, que proporcionam um volume e uma mistura adequada da fase móvel (Maldaner & Jardim, 2009).

Por outro lado, num sistema de mistura de solventes a baixa pressão (ou quaternário) apenas se utiliza uma bomba e a mistura ocorre antes da bomba por um dispositivo designado

válvula proporcional de gradiente (GPV). Esta válvula multicanal permite a combinação e mistura de quatro solventes diferentes em proporções predefinidas, desta forma a bomba pode criar gradientes binários, terciários e quaternários (Fountain & Iraneta, 2012).

No caso das bombas quaternárias é necessário uma unidade de desgaseificação para remover o ar dissolvido nos solventes, de forma a diminuir as variações da linha de base do detetor (Dong, 2019).

Os sistemas de mistura binários têm pequenos atrasos dos volumes de gradiente (por exemplo o volume entre a bomba e o início da coluna), este tipo de mistura é especialmente útil quando se utiliza baixas taxas de fluxo com colunas de diâmetro pequenos (<2,1 mm). Enquanto que os sistemas quaternários têm atrasos de volume de gradiente de três a quatro vezes superior comparativamente ao sistema de alta pressão (Fountain & Iraneta, 2012).

4.4.2 Coluna Cromatográfica

A coluna é constituída por um material específico para a separação de componentes, designado por fase estacionária. Esta tem na sua constituição pequenas partículas porosas esféricas com uma superfície específica variável ou um líquido específico caracterizado pelo seu elevado potencial de separação de componentes (Nguyen, 2006).

Na técnica de UPLC, a maioria das colunas são produzidas em aço inoxidável de forma a obterem maior resistência à pressão e têm um comprimento de 50 a 100 mm, sendo as colunas curtas de 50 mm de comprimento ideais para separações ultra rápidas (Spaggiari *et al.*, 2013).

As colunas cromatográficas utilizadas em UPLC apresentam um diâmetro interno entre 1 mm e 2,1 mm, e são revestidas com partículas com dimensão menor ou igual a 2 µm, de forma a minimizar o efeito de aquecimento dos solventes da fase móvel, uma vez que, à medida que a fase móvel flui através da fase estacionária, a temperatura da coluna aumenta devido ao aquecimento por fricção, fazendo com que a temperatura varie ao longo do comprimento e raio da coluna. Os gradientes de temperatura radial podem aumentar o alargamento da banda. A formação de gradientes de temperatura axial (longitudinal) e radial pode ser a razão para uma perda significativa de eficiência de separação (Turner & Jenkins, 2018).

As colunas com menor diâmetro ajudam a reduzir os gradientes de temperatura, isto verifica-se devido à relação superfície/volume ser relativamente maior, quando comparadas com colunas de diâmetros maiores, ajudando a dissipar o aquecimento provocado por atrito. O uso de colunas de orifício estreito com um controlo térmico otimizado pode melhorar drasticamente a eficiência da separação e a capacidade de resolução (Turner & Jenkins, 2018).

As partículas utilizadas na constituição da fase estacionária para a técnica de UPLC devem obedecer a certos requisitos, tais como, serem estáveis a uma grande faixa de pH, apresentarem uma elevada resistência física ou mecânica, e não terem interações indesejáveis com os compostos que se pretende analisar. Para além disso, as fases estacionárias devem fornecer seletividade, bom desempenho e uma vida útil aceitável (Maldaner & Jardim, 2009).

A grande variedade da constituição química das diferentes fases estacionárias pode resolver quase todos os problemas analíticos, uma vez que cada coluna fornece uma combinação diferente de hidrofobicidade, estabilidade hidrolítica e interação química com os analitos (Patil, 2015).

Uma das particularidades da tecnologia UPLC é o emprego de partículas híbridas porosas (*ethylene bridged hybrid* (BEH)) nas fases estacionárias, sendo mais resistentes mecanicamente que as partículas de sílica pura. A estabilidade química destas partículas, permite operar em condições extremas de pH (1-12), pressão e temperatura possibilitando uma tecnologia de separação versátil e robusta (Waters, 2019).

Hoje em dia vários fabricantes produzem colunas com a fase estacionária preparada a partir de sílica ou sílica híbrida e modificadas com diferentes grupos químicos: C18, C8, fenil, ciano e grupos polares embutidos (Maldaner & Jardim, 2012).

As colunas C18 e C8 são consideradas as colunas universais para a maioria das separações de UPLC e são ideais para a análise de compostos de polaridade média. Estas colunas contêm cadeias alquila trifuncionalmente ligadas à superfície da sílica, que proporcionam uma elevada estabilidade ao pH extremo e permitem a retenção, seletividade e sensibilidade de compostos ionizáveis. As fases estacionárias com cadeias C8 são menos hidrofóbicas, oferecendo menos retenção aos compostos (Guillarme & Veuthey, 2017).

A retenção e separação de moléculas hidrofílicas muito polares em cromatografia de fase reversa pode ser bastante problemática, pois o uso de reagentes de pares iónicos, modificação do pH da fase móvel, o uso de tampões concentrados e fases móveis altamente polares têm potenciais efeitos negativos sobre a deteção UV de baixo comprimento de onda e provocam sensibilidade reduzida na espectrometria de massa por *electrospray* (ESI). De forma a reduzir estes efeitos prejudiciais, foi desenvolvida a coluna de carbono grafite poroso (PGC). As partículas de PGC são esféricas e totalmente porosas, contendo uma superfície cristalina e altamente reproduzível, sem micro poros. A nível molecular o PGC é composto por folhas planas de átomos de carbono dispostos hexagonalmente ligados por ligações conjugadas na ordem dos 1,5 Å, sendo esta uma característica das moléculas de hidrocarbonetos aromáticas polinucleares de grandes dimensões (Ali *et al.*, 2013).

Os solutos de grande polaridade demonstram uma alta afinidade em relação à superfície

da grafite, o que permite obter uma boa retenção e eluição de espécies polares, o que não se verifica com as colunas tradicionais de sílica (Thermo Fisher Scientific, 2007).

As colunas revestidas com carbono grafite poroso têm a capacidade de separar isômeros geométricos e outros compostos estruturalmente relacionados. Para além disso são estáveis em todo o intervalo de pH (1-14) e não são afetadas por fases móveis agressivas. Ao serem compatíveis com todos os sistemas de solventes permitem a separação de uma ampla gama de polaridades num único ciclo cromatográfico (Thermo Fisher Scientific, 2007).

O mecanismo de retenção por grafite a partir de eluentes aquosos/orgânicos é determinado pelo balanço de três fatores: o efeito da hidrofobicidade, consequente da resistência ao rompimento da estrutura de solventes ligados a átomos de hidrogénio por analitos não ligados a átomos de hidrogénio; interações dispersivas entre o analito - fase móvel e o analito - superfície da grafite, pela qual a retenção aumenta à medida que a hidrofobicidade da molécula aumenta; e as interações dispersivas de grupos polarizáveis ou polarizados do analito com a superfície polarizável da grafite (Ali *et al.*, 2013).

4.4.3 Injetor

A amostra juntamente com a fase móvel é injetada no início da coluna, sendo iniciado o processo de separação cromatográfica. A injeção da amostra num sistema UPLC é realizada, normalmente, de forma automática num curto intervalo de tempo e com um fluxo contínuo, de forma a proteger a coluna das flutuações resultantes da utilização de altas pressões (Patil, 2015).

O volume de injeção da amostra deve ser reduzido de forma a evitar o alargamento do pico cromatográfico. Portanto a gama de volume de injeção num sistema UPLC é de 0,1 a 50 µL (Maldaner & Jardim, 2009).

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

5. Espectrometria de massa (MS)

A espectrometria de massa permite a identificação, caracterização e quantificação de compostos químicos com base nas respectivas massas moleculares e fragmentos (Vogesser & Parhofer, 2007).

Esta técnica baseia-se na ionização das moléculas da substância a analisar. Cada ião de produto primário derivado do ião molecular pode, por sua vez, sofrer fragmentação e assim por diante. Todos esses iões são separados no espectrómetro de massas de acordo com a sua relação massa-carga e são detetados de forma proporcional à sua abundância. O espectro de massas resultante consiste num gráfico da abundância relativa dos iões produzidos em função da relação massa/carga (m/z). Onde o eixo do x do espectro de massas representa a razão massa para a carga (m/z). O pico mais intenso é designado de pico de base e é atribuído à abundância relativa de 100%, os valores das abundâncias dos outros picos são determinados de forma proporcional ao pico de base (Hoffman & Stroobant, 2007).

Nesta técnica o ião correspondente à molécula inicial (ião molecular) sofre fragmentação, contudo cada molécula geralmente possui uma sequência de fragmentação característica, dessa forma é possível a identificação da estrutura química de moléculas desconhecidas ou a identificação e quantificação de moléculas alvo com base em fragmentos característicos (Pavia *et al.*, 2015).

5.1 Espectrometria de massa em tandem (MS/MS)

O espectrómetro de massa em tandem deve sempre realizar os seguintes processos: produzir iões da amostra na fonte de ionização, separar esses iões de acordo com a sua relação massa/carga no analisador de massa, fragmentar os iões selecionados e analisar os fragmentos num segundo analisador, detetar os iões que emergem do segundo analisador e medir a sua abundância com o detetor que os converte em sinais elétricos, e processar os sinais do detetor que são transmitidos para o software (Hoffman & Stroobant, 2007; Pavia *et al.*, 2015).

5.2 Método de ionização

Existem diversos métodos de ionização que podem ser utilizados em LC-MS, tais como, *termospray* (TSP), *electrospray* (ESI), ionização química de pressão atmosférica (APCI) e fotoionização por pressão atmosférica (Hoffman & Stroobant, 2007).

5.2.1 Ionização por *Electrospray* (ESI)

Antes do processo de ionização, independentemente da técnica, é necessário a formação de adutos, que é promovida com a adição de agentes ionizantes na fase móvel, isto consiste, na ionização do ião molecular (M) do composto que pode ganhar ou perder iões. Dependendo das propriedades do composto pode-se utilizar a polaridade positiva (adutos positivos) ou negativa (adutos negativos). Na polaridade positiva os adutos mais usuais são $[M - H]^+$, $[M + Na]^+$, $[M + K]^+$, $[M + NH_4]^+$, enquanto que na polaridade negativa o mais comum é $[M - H]^-$ (Holčapek *et al.*, 2010).

O ESI é a técnica de ionização mais utilizada em UPLC-MS, devido à sua boa eficiência de ionização e excelente sensibilidade. Esta é normalmente empregue na ionização de compostos polares, de polaridade média e espécies iónicas. Permite a análise de grandes polímeros, polímeros sintéticos, compostos organometálicos e outros analitos lábeis (Nováková *et al.*, 2012).

Na técnica de ionização *electrospray* (ESI) o eluente, proveniente do LC, é introduzido por um tubo capilar de pequeno diâmetro interno, para a câmara de ionização, ficando sobre um forte campo elétrico, formado pela aplicação de uma diferença de potencial de poucos quilovolts (kV), entre o capilar e a solução, produzindo uma acumulação de carga na superfície do líquido no final do capilar, no qual o líquido se desintegra para originar gotículas altamente carregadas. Posteriormente, estas gotículas passam por uma cortina de gás inerte aquecido (normalmente azoto com fluxos superiores a 500 L/h e temperaturas superiores a 350°C) ou através de um capilar aquecido, estas devido à pressão das cargas acumuladas sofrem tensão na sua superfície que ao ser quebrada resulta de uma mudança de forma para um cone de Taylor. Ocorre a evaporação das moléculas de solvente, provocando uma redução do tamanho das gotículas e o consequente aumento de carga por unidade de volume. Sobre a influência de um campo magnético forte estas gotículas deformam-se e alongam-se produzindo assim um novo cone de Taylor. Estas gotas continuam a perder volume e quando o campo magnético na sua superfície fica elevado o suficiente acontece a desadsorção dos iões, que passam depois pelo cone de extração para a região de vácuo do MS para a análise de massas (Hoffman & Stroobant, 2007; Vogeser & Parhofer 2007).

5.3 Analisador de massas

Os iões após serem produzidos são separados pela sua razão massa carga no analisador. Existem diferentes tipos de analisadores de massa, tais como o quadrupolo (Q), armadilha de iões (IT), tempo de voo (TOF), transformadas de Fourier (FT) e analisadores de massa Orbitrap. Os Instrumentos MS variam em tamanho, preço, resolução, gama de massa e na sua capacidade de

realizar espectrometria de massa em tandem (MS / MS) (Makarov & Scigelova, 2010).

5.3.1 MS/MS – Triplo Quadrupolo (QqQ) e MS single

Um quadrupolo linear é constituído por quatro hastes metálicas hiperbólicas ou cilíndricas que são posicionadas de forma paralela em uma matriz radial. As hastes opostas são carregadas por um potencial negativo ou positivo de corrente contínua (DC) na qual uma voltagem de corrente alternada de radiofrequência (RF) oscilante é sobreposta. Numa dada combinação de potencial de corrente contínua (DC) e de corrente alternada de radiofrequência (RF) aplicada às hastes as trajetórias dos iões de um determinado m/z são estáveis. E esses iões são transmitidos para o detetor. Os iões com outros m/z têm trajetórias instáveis e não passam pelo filtro de massa sendo descarregados nas hastes e/ou perdidos no sistema de vácuo (El-Aneed *et al.*, 2009; Niessen, 2006).

Em *tandem* MS (MS/MS) ocorre a combinação de dois filtros de massa de quadrupolo e as moléculas do analito alvo do primeiro quadrupolo são submetidas a uma fragmentação controlada numa célula de colisão. O monitoramento múltiplo de reação (MRM) é o modo mais comum de aquisição utilizado em MS/MS de triplo quadrupolo para análises quantitativas permitindo uma maior sensibilidade e seletividade (Schreiber, 2010).

O analisador de massa triplo quadrupolo quando operado no modo de MS/MS consiste em três quadrupolos: Q1, Q2 e o Q3 colocados em sucessão. O Primeiro (Q1) e o terceiro (Q3) operam como analisadores de massas no qual os iões podem ser separados pelo seu valor de m/z , enquanto que o segundo (Q2) como uma célula de colisão, onde os iões que saem do Q1 sofrem dissociação por colisão com um gás inerte (Mcmaster, 2005).

O espectrómetro de massa triplo quadrupolo opera, essencialmente com o mesmo princípio que o analisador de massa de quadrupolo linear. Os dois filtros de massas Q1 e Q3 são constituídos por 4 hastes de metal cilíndricas paralelas precisamente combinadas onde a separação de massa é realizada pelo movimento vibratório estável dos iões num campo elétrico oscilante de alta frequência que é criado pela aplicação de potenciais de corrente continua e de radiofrequência (RF) a esses eletrões. Enquanto que a célula de colisão Q2 é submetida apenas ao potencial RF (Dass, 2007).

Dentro do primeiro Quadrupolo (Q1), o m/z do analito alvo ionizado intacto (ião precursor) é selecionado e todas as outras espécies de iões são filtradas. De seguida os iões selecionados que compartilham a proporção de massa para a carga (m/z) semelhante são transferidos continuamente para a célula de colisão. Na célula de colisão (Q2) os iões sofrem uma

colisão com moléculas de gás inerte (por exemplo, hélio, azoto, árgon), originando a transferência de energia cinética do fluxo de gás formando fragmentos de iões de produto característicos. Este processo é chamado de dissociação induzida por colisão (CID). É necessário haver um controlo da pressão do gás, visto que, se a pressão do gás for muito alta, o feixe de iões poderá se espalhar e o sinal será perdido, por outro lado se a pressão do gás for muito baixa, ocorrerá uma fragmentação insuficiente. A totalidade desses iões de fragmento é direcionada para o terceiro quadrupolo (Q3) (Balong, 2008).

As configurações de radiofrequência do terceiro quadrupolo analítico são ajustadas de maneira a que somente um ião do fragmento selecionado passe, alcançando o detetor de iões, enquanto todos os outros fragmentos de iões são eliminados (Figura 5.1) (Vogeser & Parhofer, 2007).

A seleção das massas do primeiro e segundo quadrupolo, definindo a respetiva “transição de massa”, pode ser alterada dentro de frações de segundo, permitindo a monitorização de um grande número de diferentes transições de massa em paralelo num ciclo analítico, ocorrendo uma quantificação multi-compostos (Vogeser & Parhofer, 2007).

Na análise MS/MS é vantajoso monitorizar duas ou três transições de MRM para cada analito, uma quantificadora, que será utilizada para a elaboração da reta de calibração por apresentar uma melhor relação sinal-ruído e não exibir nenhuma evidência de interferências cromatográficas significativas e outra qualificadora, que permite confirmar se o pico cromatográfico obtido corresponde ou não ao analito em estudo (SANTE, 2017).

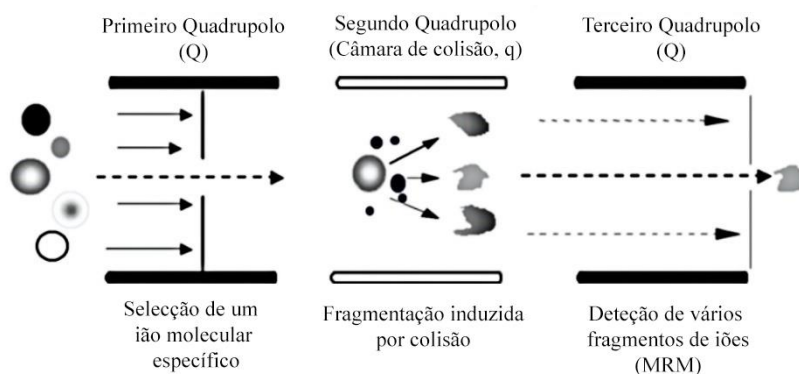


Figura 5.1: Configuração do analisador de massa triplo quadrupolo operado no modo MRM (dois ou mais fragmentos) (Adaptado de Locatelli *et al.*, 2012).

6. Método de extração

Na determinação de resíduos de contaminantes e pesticidas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é fundamental uma etapa de preparação da amostra antes da análise instrumental de forma a se obter bons resultados analíticos (Lucci *et al.*, 2014). Esta necessidade deve-se ao facto dos analitos estarem presentes em concentrações muito baixas, assim como à complexidade da maioria das matrizes, que podem conter em quantidades altas compostos interferentes, tais como a clorofila e os lípidos. Dessa forma os principais objetivos da etapa de preparação das amostras são promover a extração dos analitos de interesse e remover as substâncias interferentes, sem que ocorra perda dos analitos, de forma a não afetar adversamente os resultados da análise (Wilkowska & Biziuk, 2011).

Atualmente o método de extração Quechers é o método mais utilizado a nível mundial para a determinação de resíduos de pesticidas em matrizes alimentares por possibilitar de uma forma rápida e económica a análise de um grande número de pesticidas em simultâneo (CVUA Stuttgart, 2016). Contudo este método não permite a extração de pesticidas ou contaminantes altamente polares.

Em 2006, no laboratório de referência da União Europeia para métodos de resíduos únicos, foi desenvolvido o QuPPE (*Quick Polar Pesticides*), método rápido para a análise de resíduos de pesticidas altamente polares em alimentos de origem vegetal, como frutos, vegetais, cereais, leguminosas secas, sementes, nozes e mel. Este método multiresíduos permite a extração em simultâneo de um número elevado de pesticidas e contaminantes polares e dos seus metabolitos, envolvendo a extração com metanol acidificado e determinação por LC-MS/MS (Anastassiades, 2017).

O método consiste na extração após o ajuste do teor de água e adição de metanol acidificado com ácido fórmico, em uma porção de amostra previamente homogeneizada. De seguida a mistura obtida é centrifugada, filtrada e analisada diretamente no equipamento de LC-MS/MS (Anastassiades, 2017).

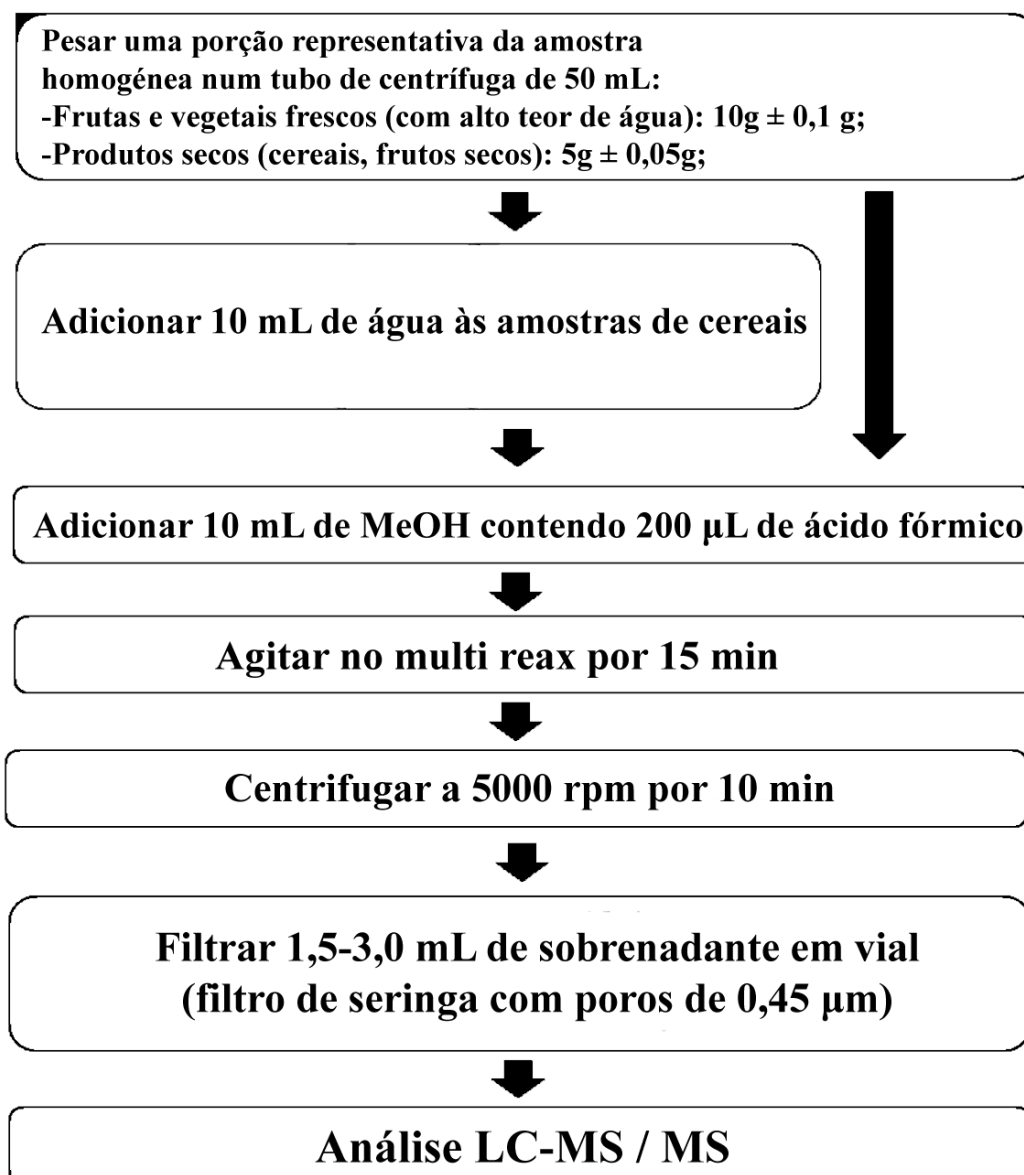


Figura 6.1: Resumo do método de extração QuPPe.

6.1 Calibração correspondente à matriz sem Padrão Interno (IS)

Quando não se utiliza nenhum padrão interno (IS) é necessário compensar adequadamente os efeitos matriz, recorrendo a calibrações correspondentes à matriz. Neste caso assume-se que o volume total do extrato da amostra é 20 mL (10 mL de MeOH + 10 mL H₂O).

A fração de massa (w_r) de um determinado pesticida presente numa mistura, pode ser calculada a partir da equação que se segue, usando a área do pico do pesticida (A_{pest}^{pico}) obtido a partir do extrato da amostra, um fator de correção (V) e a massa da porção inicial da amostra (m_a).

$$w_r = \frac{(A_{pest}^{pico} - b_{cal})}{a_{cal}} \times \frac{1}{m_a} \times V_{final} \left(\frac{mg}{kg} \right)$$

Onde V_{final} é o volume total do extrato da amostra (20 mL), a_{cal} é o declive da reta de calibração, b_{cal} é a interceção da reta de calibração.

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

7. Validação do método analítico

O objetivo de qualquer método analítico é fornecer dados consistentes, confiáveis e precisos. Por esta razão, os desempenhos e as limitações do método, bem como as influências externas que podem modificar essas características, devem ser determinadas antes do seu uso. Dessa forma a validação desempenha um papel importante na concretização desse objetivo (Vicente *et al.*, 2015).

A validação de métodos analíticos é fundamental de forma a demonstrar e garantir que o método é adequado ao uso pretendido. Resultados não fiáveis podem colocar em causa a metodologia, e consequentemente, neste caso em particular, a saúde do consumidor (Vicente *et al.*, 2015).

Na validação é necessário a realização de todos os procedimentos que demonstrem que um método específico usado para a quantificação de analitos específicos em uma determinada matriz é confiável e reprodutível (IAS, 2016).

Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa e compreendem o estudo dos seguintes parâmetros: gama de trabalho/linearidade, limiares analíticos (detecção e quantificação), precisão e exatidão (Relacre, 2000).

No presente trabalho foram seguidos os critérios de aceitação dos diferentes parâmetros do guia SANTE (SANTE, 2017).

7.1 Parâmetros estudados no processo de validação do método

7.1.1 Reta de calibração

A calibração é um processo pelo qual se relaciona a resposta de um sistema de medida com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida. Para a construção da reta preparam-se padrões de concentração conhecida do analito a quantificar de forma a abranger a gama total das concentrações das amostras a analisar. Através do sinal obtido pelo equipamento e da concentração do analito, é possível a determinação, da concentração do analito na amostra (ISO, 1990).

Na forma algébrica da equação de uma reta y representa a área do pico cromatográfico (ou sinal do composto), a a ordenada na origem, b o declive da reta, e x a concentração de analito.

$$y = a + bx$$

No processo de calibração, o coeficiente de correlação (r) é um parâmetro importante para a aceitação da reta de calibração e pode ser determinado a partir da equação abaixo descrita. As retas de calibração devem ter um coeficiente de correlação igual ou superior a 0,9950 (Relacre, 2000).

$$r = \frac{\sum_{i=1}^N \{(xi - \bar{x})\} \cdot \{(yi - \bar{y})\}}{\sqrt{[\sum_{i=1}^N (xi - \bar{x})^2] \cdot [\sum_{i=1}^N (yi - \bar{y})^2]}}$$

7.1.2 Gama de Trabalho/Linearidade

Num método quantitativo é necessário determinar a gama de concentrações onde o método de ensaio é aplicável. A gama de trabalho de um método analítico é normalmente estabelecida a partir de estudos de linearidade e corresponde ao intervalo compreendido entre a concentração mais alta e mais baixa do analito, para o qual existe um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade (ICH, 2005).

Quando se escolhe uma gama de trabalho, deve ter-se em consideração os limites legislados/recomendados do analito em estudo, tal como o limite de quantificação (LQ) para a escolha do extremo inferior da curva, assim como o sistema de deteção do instrumento para a escolha do extremo superior (Magnusson & Örnemark, 2014).

A linearidade de um método analítico corresponde à capacidade do método em obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, construindo uma reta linear, dentro de um intervalo estabelecido, verificando assim a existência de uma relação linear entre os valores medidos e as concentrações padrão (Ribani *et al.*, 2004).

As retas padrão de calibração podem ser efetuadas de três formas diferentes, dependendo da metodologia: através da adição de padrões em solvente (reta de calibração em solvente), adição de padrões em extrato de matriz (reta de calibração em matriz) ou adição de padrões em matriz e que são posteriormente processados através do procedimento de extração (método de adição padrão). Para a realização da reta de calibração são recomendados no mínimo 5 pontos de concentração conhecida do analito em estudo, distribuídos de igual modo na gama de trabalho estipulada (EMEA, 2009; SANTE, 2017).

De forma a avaliar a linearidade pode-se recorrer a uma representação gráfica da função juntamente com o cálculo do coeficiente de correlação, no entanto como o coeficiente de correlação é um bom indicador de correlação, mas não necessariamente de linearidade, torna-se necessário a realização de outros testes estatísticos que garantam a linearidade do método (Relacre, 2000).

Existem vários testes que permitem estudar a linearidade associada a uma determinada reta de calibração. No presente trabalho avaliou-se a linearidade através do teste dos residuais e de Grubbs.

7.1.2.1 Teste dos Residuais

O teste dos residuais consiste no desvio das concentrações calculadas dos padrões de calibração ($C_{\text{calculado}}$) pela função de calibração a partir das concentrações reais ($C_{\text{verdadeira}}$) utilizando a curva de calibração. O desvio (%) é calculado a partir da seguinte equação:

$$\text{Desvio das concentrações (\%)} = \frac{C_{\text{calculado}} - C_{\text{verdadeira}}}{C_{\text{verdadeira}}} \times 100$$

O desvio das concentrações não deve ser superior a $\pm 20\%$ (Omeroglu *et al.*, 2018; SANTE, 2017).

7.1.2.2 Teste de Grubbs

O teste de Grubbs permite detetar *outliers* em um conjunto de dados que apresenta uma distribuição normal. Este pode ser definido como duas hipóteses: H_0 , não existe nenhum *outlier* num conjunto de dados e H_1 , existe pelo menos um *outlier* num conjunto de dados. A fórmula geral para a estatística do teste de Grubbs é definida como (Kuppusamy & Kaliyaperumal, 2013):

$$G = \frac{\max |Y_i - \bar{Y}|}{s}$$

Onde Y_i é o elemento do conjunto de dados, \bar{Y} e s correspondem à média e ao desvio padrão do conjunto de dados, respetivamente.

Existe uma alternativa unilateral que permite testar se o valor mínimo (Y_{\min}) e o valor máximo (Y_{\max}) do conjunto de dados são *outliers*. As estatísticas de teste são calculadas de acordo com as seguintes equações (Ellison *et al.*, 2009):

$$G = \frac{\bar{Y} - Y_{\min}}{s} \qquad G = \frac{Y_{\max} - \bar{Y}}{s}$$

Se o valor calculado ($G_{\text{calculado}}$) for superior ao valor tabelado para n observações ($G_{\text{crítico}}$) para um grau de confiança de 95% e/ou 99% o valor testado é considerado um *outlier* e deve ser rejeitado. O teste de Grubbs é repetido de forma a se verificar se existe outros valores discrepantes (Ellison *et al.*, 2009).

7.1.3 Especificidade/Seletividade

Os termos seletividade e especificidade são normalmente usados de forma intercambiável. Estes avaliam a capacidade de um método analítico em identificar e distinguir inequivocamente o analito de interesse na presença de outras substâncias, endógenas e exógenas, numa matriz complexa nas condições estabelecidas pelo método (UNODC, 2009).

A selectividade refere-se à resposta que um método analítico apresenta para um determinado número de substâncias presentes numa amostra, enquanto que a especificidade normalmente refere-se a um método que produz apenas uma resposta para um único analito numa amostra heterogénea. Como existem poucos métodos analíticos a responder a um único analito, o termo selectividade é mais apropriado que especificidade (NATA, 2012).

O método é considerado seletivo se houver uma elevada resolução do pico cromatográfico do analito ou seja, os cromatogramas em branco não apresentam picos ou distorções de linha de base próximas ao tempo de retenção do analito e os picos cromatográficos de compostos interferentes não se sobrepõem ao do analito (Vicente *et al.*, 2015).

Os métodos que empregam procedimentos altamente específicos, como a cromatografia acoplada à espectrometria de massa, têm a capacidade de serem muito seletivos. Os cromatogramas devem ter picos com o formato, tempo de retenção, e razão de resposta semelhantes aos obtidos a partir de um padrão de calibração com uma concentração de analito comparável. Para além disso os picos cromatográficos de diferentes iões para o mesmo analito devem se sobrepor uns aos outros. Se um cromatograma de iões mostrar evidências de interferência cromatográfica não se deve considerar para identificar ou quantificar um analito (SANCO, 2011).

7.1.4 Limite de deteção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O limite de deteção (LD) corresponde à quantidade mínima de analito numa amostra que é possível detetar com um nível de certeza razoável, mas não é necessariamente quantificado como um valor exato. Uma leitura inferior ao limite de deteção não significa a ausência do analito, apenas possibilita afirmar que a concentração do componente em questão é inferior a um certo valor (Relacre, 2000).

Este limiar analítico corresponde ao início do intervalo em que é possível distinguir com uma confiança estatística, por norma de 95%, o sinal do branco do sinal da amostra, permitindo dessa forma indicar a presença ou ausência do analito (IPAC, 2011).

O limite de quantificação (LQ) avalia a menor concentração ou massa do analito presente na amostra que pode ser detetado e quantificado com precisão e exatidão aceitável, nas condições experimentais estabelecidas. Ou seja, o LQ corresponde ao início da gama, onde o coeficiente de variação do sinal e a incerteza relativa são reduzidos a valores razoáveis, proporcionando desta forma uma avaliação quantitativa. Em termos práticos, este limiar corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (SANTE, 2017; IPAC, 2011).

Os valores numéricos obtidos entre o intervalo de LD e LQ não se devem reportar, dado que esse intervalo é considerado uma zona de detecção semi-quantitativa e não quantitativa.

Segundo as recomendações da IUPAC, o valor do LD encontra-se acima do sinal médio do branco (x_0), a cerca de 3 vezes o desvio-padrão do branco e o LQ situa-se a 10 vezes o referido desvio-padrão.

Os limiares analíticos podem ser determinados experimentalmente, através da análise de um número apropriado de amostras em branco (em condições de rotina e em dias diferentes) e o cálculo da média e do desvio padrão das respostas obtidas (Garcia, 2011).

Quando o método envolve a utilização de uma calibração linear o LD e LQ podem ser determinados a partir dos mínimos quadráticos da reta de calibração, considerando-se que o desvio padrão da estimativa ($S_{y/x}$) representa o desvio padrão dos residuais e interpolando o correspondente valor em concentração obtém-se as seguintes equações:

$$LD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{\text{Declive}} \quad LQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{\text{Declive}} \quad S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_{\text{teórico}} - y_{\text{experimental}})^2}{n-2}}$$

7.1.5 Exatidão

A exatidão expressa o grau de concordância entre o valor verdadeiro de concentração do analito e o resultado médio dos valores obtidos pela aplicação de um determinado procedimento experimental. Este parâmetro está intimamente relacionado com os erros sistemáticos (EMEA, 2009).

Os processos normalmente utilizados na avaliação da exatidão de um método analítico são: a participação em ensaios interlaboratoriais, o uso de materiais de referência certificados, comparação com métodos de referência e a realização de ensaios de recuperação (Cassiano *et al.*, 2009).

7.1.5.1 Ensaios de recuperação

O ensaio de recuperação consiste na adição de uma quantidade conhecida do analito em estudo (padrão) numa amostra, verificando-se posteriormente a capacidade do método em recuperar essa quantidade. Os critérios de aceitação podem variar consoante o método e concentração adicionada. Para contaminantes e pesticidas o mais usual é um critério entre 70% a 120%. Sendo deste modo o valor da exatidão apresentado sobre a forma de percentagem de recuperação, que é calculada a partir da seguinte equação (SANTE, 2017):

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C(\text{amostra} + \text{padrão}) - C_{\text{amostra}}}{C_{\text{padrão}}} \times 100$$

O ensaio de recuperação pode ser efetuado numa matriz representativa sem analito nativo ou numa matriz contendo uma concentração baixa de analito (amostra positiva). Contudo, em ambos os casos as amostras devem ser fortificadas com o analito em pelo menos duas concentrações diferentes, dentro da gama de trabalho estipulada, antes de sofrerem o processo de extração, sendo a primeira concentração ao nível do LQ e a outra cerca de 2 a 10 vezes o valor da concentração do LQ. É necessário a preparação de pelo menos 5 repetições para cada concentração de forma a se obter uma boa estimativa da recuperação média do analito e a incerteza associada a esse valor (Thompson, 2002; SANTE, 2017).

7.1.6 Precisão

A precisão é definida como uma medida de dispersão, ou seja, o grau de concordância entre os resultados de ensaios analíticos independentes obtidos por aplicação do método experimental sob as condições estipuladas e é expressa em função do desvio padrão que descreve a distribuição dos resultados. Quanto menor a parte aleatória dos erros experimentais que afetam o resultado (coeficiente de variação), mais preciso é o procedimento (SANTE, 2017). Esta dispersão pode ser avaliada através de três determinações designadas por repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade (Magnusson & Örnemark, 2014).

7.1.6.1 Repetibilidade

A repetibilidade é a precisão de medição de um método de ensaio efetuado em condições experimentais semelhantes, isto é, no mesmo laboratório, com a mesma amostra, pelo mesmo analista, mesmo tipo de equipamento, mesmo tipo de reagentes em curtos períodos de tempo (usualmente no mesmo dia) (CIPAC, 2003).

A repetibilidade é normalmente expressa em termos de imprecisão e calculada como desvio padrão, variância ou coeficiente de variação (CV) dos resultados do teste. Para a determinação da repetibilidade é necessário um mínimo de 5 medições sobre a mesma amostra ou padrões em condições de repetibilidade, em pelo menos dois níveis de concentração (SANTE, 2017; HSE, 2002).

O limite de repetibilidade pode ser definido como o valor abaixo do qual a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos sobre as condições experimentais acima referidas, pode ser esperado com uma probabilidade específica, normalmente de 95% (SANTE, 2017).

O limite de repetibilidade (r) para um nível de confiança de 95%, é avaliada pela seguinte equação (Relacre, 2000):

$$r = 2,8 \times \sqrt{S_{ri}^2}$$

Onde, S_{ri} representa o desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados considerados.

O coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r), para cada nível de concentração, é dado por:

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100$$

Sendo, (S_{ri}) o desvio padrão de repetibilidade, para cada nível i de concentração e \bar{x} a média dos valores considerados (Relacre, 2000).

7.1.6.2 Precisão Intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo-se exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como diferentes analistas, diferentes equipamentos e/ou diferentes dias. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados num laboratório, sendo dessa forma a mais aconselhável de se usar.

Para se determinar a precisão intermédia efetuam-se n medições em replicado, duplicado ou em ensaio único sobre a amostra, em condições pré-definidas (INMETRO, 2003; Relacre, 2000).

7.1.7 Incertezas de medição

A definição de incerteza de medição de acordo com o guia Eurochem é “ Um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem com razoabilidade ser atribuídos ao mensurando” (Ellison & Williams, 2012).

Quando se pretende fazer uma estimativa de incerteza deve-se ter em conta todos os efeitos reconhecidos que operam no resultado. Na prática é usual em análises de medição considerar as incertezas de elementos associados ao desempenho geral do método, como a precisão e a exatidão (Ellison & Williams, 2012).

7.1.7.1 Incerteza associada à Precisão e Exatidão do método

Por norma nos ensaios químicos a incerteza associada à precisão é uma componente importante da incerteza total do método. De modo a garantir que esta incerteza é representativa da variabilidade dos ensaios, deve ser avaliada em condições de precisão intermédia. Quando não é possível assegurar as condições de precisão intermédia, esta componente pode ser quantificada em condições de repetibilidade (Relacre, 2018).

A incerteza da precisão pode ser calculada a partir de um material ou de uma amostra estável recorrendo-se à equação (Relacre, 2018):

$$u_{\text{precis}} = \frac{CA}{\sqrt{3}}$$

Onde CA é o valor limite do critério de aceitação do desvio padrão da precisão verificada nos replicados e $\sqrt{3}$ é o valor assumido para uma distribuição retangular.

A incerteza associada à exatidão pode ser efetuada com base em ensaios de fortificação/recuperação, segundo a seguinte equação:

$$u_{\text{ver}}(\bar{R}) = \bar{R} \times \frac{S_{\text{obs}}}{\sqrt{n}}$$

No qual, o S_{obs} representa o desvio padrão associado aos ensaios de recuperação efectuados; n o número de ensaios de amostras fortificadas; (\bar{R}) a recuperação média das amostras fortificadas.

7.1.7.2 Incerteza Combinada

A partir dos componentes de incerteza (precisão e exatidão) determinados através dos dados de validação do ensaio é possível a determinação da incerteza combinada, que se baseia na lei da propagação (Relacre, 2018).

Para modelos envolvendo só uma soma ou uma diferença a incerteza combinada pode ser calculada a partir da equação (Ellison & Williams, 2012):

$$u_c(Y(p,q,...)) = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + \dots}$$

No caso da combinação da incerteza associada à precisão e exatidão, a equação anterior fica:

$$u_c = \sqrt{(u(\text{precisão}))^2 + (u(\text{exatidão}))^2}$$

7.1.7.3 Incerteza Expandida

A determinação da incerteza expandida é necessária de modo a fornecer o valor do mensurado sob a forma de um intervalo que transmita com um nível de confiança elevado (normalmente de 95% ou 99%) (Relacre, 2018).

O cálculo da incerteza expandida (U) consiste na multiplicação da incerteza combinada pelo fator de expansão selecionado (K):

$$U = u_c \times K$$

A escolha do fator K depende do nível de confiança desejado. Por norma considera-se uma expansão normal e é utilizado o fator de expansão igual a 2 (k=2), que corresponde a um nível de confiança de 95% (Ellison & Williams, 2012).

7.1.8 Razão iónica

A razão iónica consiste na razão entre o sinal do pico do ião menos intenso (qualificador) e o sinal do pico do ião mais intenso (quantificador). A razão iónica de referência é a média obtida a partir das razões iónicas dos padrões de calibração em solvente ou dos padrões de calibração em matriz, avaliados na mesma sequência e nas mesmas condições que as amostras. Para a

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

determinação da razão iônica de referência as respostas fora da gama linear devem ser excluídas (SANCO, 2011; SANTE, 2017).

Segundo o guia SANTE, a razão iônica das amostras deve ser $\pm 30\%$ (relativa) da média dos padrões de calibração da mesma sequência.

8. Parte experimental

A metodologia, que foi seguida, teve como base o método “QuPPE – *Quick Polar Pesticides Method*” que consiste num método rápido para análise de compostos altamente polares em alimentos de origem vegetal por LC-MS/MS envolvendo a extração com metanol, do guia da comissão europeia EURL-SRM, versão 9.3. Este procedimento é atualmente o procedimento de referência para a extração de cloratos e percloratos neste tipo de matrizes.

8.1 Material e Equipamento

Para o desenvolvimento e realização deste trabalho experimental foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos: material de vidro comum num laboratório de química (Classe A); moinho triturador para frutos e vegetais da marca Retsch e modelo GM 300; moinho triturador de cereais da marca Retsch e modelo GM 200; micropipetas calibradas (externamente) da marca EPPENDORF: Micropipeta: 1-10 μ L, Micropipeta: 10-100 μ L, Micropipeta 100-1000 μ L; tubos de falcon de plástico de 50 mL; Balança analítica da marca VWR e modelo SE 203-LWa, com precisão de 0,0001 g; sistema de purificação de água Tipo 1 da marca Milipore; centrifuga da marca Hettich e modelo Universal 320 R; agitador mecânico (multi reax) marca Heidolph; seringas descartáveis; filtros com membrana de polipropileno com poros de dimensão 0,45 μ m; equipamento de UHPLC: Bruker: Elute UHPLC, Pump HPG 1300, com autosampler; equipamento de MS/MS (triplo quadrupolo): Bruker: EVOQ Qube.

8.2 Reagentes e preparação de soluções

Os reagentes utilizados foram metanol (CH_3OH) a 99,9% da marca Riedel-de Haen, Honeywell (grau: LC-MS); ácido fórmico (CH_2O_2) para LC-MS, da marca Carlo Erba; ácido acético glacial, da marca VWR; Solução padrão comercial 1000 mg/L de Clorato (ClO_3^- em H_2O) da marca VWR; Solução padrão comercial de 1000 mg/L de Perclorato (ClO_4^- em H_2O) da marca VWR. Solução de extração de MeOH acidificado (100 mL de metanol + 200 μ L de ácido fórmico).

Fase móvel

Para a preparação da fase móvel A adicionou-se, num balão volumétrico de 1000 mL, 50 mL de metanol, 10 mL de ácido acético glacial, 940 mL de água ultra pura. Enquanto que na preparação da fase móvel B, adicionou-se 990 mL de metanol e 10 mL de ácido acético glacial num balão volumétrico de 1000 mL.

8.2.1 Preparação das soluções padrão e de controlo

A partir das soluções padrão comerciais de 1000 µg/mL de cloratos e percloratos preparou-se as soluções padrão intermédias 1 e 2.

Solução padrão intermédia 1

A partir da solução padrão comercial de 1000 µg/mL de cloratos e percloratos, pipetou-se 100 µL de cada uma para um balão de 10 mL e fez-se com água, de forma a se obter uma solução padrão intermédia com uma concentração de 10,0 µg/mL.

Solução padrão intermédia 2

A partir da solução com concentração de 10,0 µg/mL (Solução padrão intermédia 1) pipetou-se 1000 µL para um balão de 10 mL e fez-se com água, para se obter a solução padrão com concentração de 1,00 µg/mL.

8.2.2 Reta de Calibração em extrato

Para a preparação das retas de calibração em extrato (amostra/matriz) foi utilizada a solução padrão intermédia 2 com concentração de 1,00 µg/mL.

Na tabela 8.1 e 8.2, encontram-se descritos os volumes de solução intermédia 2 e de extrato utilizados para a obtenção da concentração de cada ponto de calibração, para frutos, vegetais e cereais, respetivamente.

Por cada dia de análise foram preparados dois padrões de controlo (PC1 e PC2) para cada matriz e cada analito em estudo. A concentração do PC1 foi preparada ao nível do LQ (0,0100 mg/kg) e a concentração do PC2 ao nível do último ponto da reta de calibração. Os padrões de controlo foram preparados com misturas independentes das misturas da reta de calibração.

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Tabela 8.1: Volumes de solução intermédia e de extrato utilizados para a preparação dos pontos de calibração das retas elaboradas nas matrizes de frutos e vegetais.

Pontos de Calibração	Volume solução intermédia 2 (µL)	Volume de extrato (µL)	Volume final (µL)	Conc. (µg/mL)	Conc. (mg/kg)
1 (PC1)	5	995	1000	0,00500	0,0100
2	10	990	1000	0,0100	0,0200
3	25	975	1000	0,0250	0,0500
4	40	960	1000	0,0400	0,0800
5 (PC2)	50	950	1000	0,0500	0,100

Tabela 8.2: Volumes de solução intermédia e de extrato utilizados para a preparação dos pontos de calibração das retas elaboradas nas matrizes de cereais.

Pontos de Calibração	Volume solução intermédia 2 (µL)	Volume de extrato (µL)	Volume final (µL)	Conc. (µg/mL)	Conc. (mg/kg)
1 (PC1)	2,5	997,5	1000	0,00250	0,0100
2	5,0	995	1000	0,00500	0,0200
3	10	990	1000	0,0100	0,0400
4	25	975	1000	0,0250	0,100
5	40	960	1000	0,0400	0,160
6 (PC2)	50	950	1000	0,0500	0,200

8.2.3 Reta de Calibração em extrato de sopas para cloratos e percloratos

Para a realização do ponto 1, 2, 3, e 4 da curva foi utilizado a solução padrão intermédia 2 enquanto que o ponto 5 foi feito a partir da solução padrão intermédia 1 (tabela 8.3). A reta de calibração nestas matrizes foi diferente das restantes devido a suspeitar-se que poderiam conter teores elevados de cloratos e/ou percloratos.

Tabela 8.3: Volumes de solução intermédia e de extrato utilizados para a preparação dos pontos de calibração das curvas elaboradas nas matrizes das sopas.

Pontos de Calibração	Volume solução intermédia (µL)	Volume de extrato (µL)	Volume final (µL)	Conc. (µg/mL)	Conc. (mg/kg)
1	5,0	995	1000	0,00500	0,0100
2	25	975	1000	0,0250	0,0500
3	50	950	1000	0,0500	0,100
4	100	900	1000	0,100	0,200
5	10	990	1000	0,250	0,500

8.2.4 Preparação das Fortificadas para o ensaio de recuperação

A recuperação dos analitos em estudo foi avaliada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas dos mesmos, de acordo com a gama de trabalho escolhida. Dessa forma, no caso dos frutos e vegetais as matrizes foram fortificadas com a concentração mais baixa da gama de trabalho, 0,0100 mg/kg (0,00500 µg/mL) e com uma concentração intermédia de 0,0300 mg/kg (0,0150 µg/mL) para cloratos e percloratos. No caso dos cereais, foram fortificados com a concentração mais baixa da gama, 0,0100 mg/kg (0,00250 µg/mL) e com uma concentração intermédia de 0,0200 mg/kg (0,00500 µg/mL) de cloratos e percloratos (Tabela 8.4).

Para a preparação das amostras fortificadas, pipetou-se da solução padrão intermedia diretamente na amostra antes do processo de extração, tendo-se agitado as amostras de forma a incorporar e homogeneizar os compostos na matriz fortificada.

Tabela 8.4: Volumes de solução intermédia 1 na fortificação das matrizes de frutos e vegetais e cereais.

Fortificadas	Matriz	Volume solução intermédia 1 (µL)	Massa da amostra (g)	Conc. (µg/mL)	Conc. (mg/kg)
1	Frutos e vegetais	10	10,0	0,00500	0,0100
2	Frutos e vegetais	30	10,0	0,0150	0,0300
1	Cereais	5	5,00	0,00250	0,0100
2	Cereais	10	5,00	0,00500	0,0200

8.2.5 Reta de calibração em Solvente, MeOH

Para a realização das curvas de calibração utilizou-se o solvente metanol e a solução padrão intermédia 2. A reta de calibração foi preparada como descrito na tabela 8.1, tendo-se substituído o volume de extrato por volume de solvente.

8.3 Amostras

8.3.1 Amostras para a implementação e validação do método

Para a implementação e validação do método foram utilizados grupos alimentares distintos: cereais e frutos e vegetais. No caso dos cereais utilizou-se o milho e o arroz, enquanto que no caso das frutos e vegetais utilizou-se a cenoura, o pimento, o tomate, a abóbora, os brócolos, a ginja, as uvas e a laranja. Cada um destes produtos pertence a grupos específicos:

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

cereais, vegetais altamente pigmentados, vegetais com grande quantidade de água, citrinos, bagas, etc., tendo-se seguido o guia SANTE para as escolhas de quais as matrizes a validar.

8.3.2 Amostras reais

Procedeu-se à determinação de cloratos e percloratos em amostras de sopa de vegetais, creme de abóbora com manjerição sem batata, creme de vegetais com espinafres sem batata, enviadas por clientes da SGS, de forma a realizar o método em amostras reais.

8.3.3 Preparação e extração das amostras pelo método QuPPe

Triturou-se os alimentos de forma a se obter amostras de tamanho reduzido e homogêneas. Em seguida, no caso dos frutos e vegetais frescos, pesou-se $10,0 \pm 0,1$ g da amostra homogeneizada para um tubo de falcon de 50 mL, enquanto que no caso dos cereais pesou-se uma toma de 5,00 g com uma precisão de 0,05 g. No caso dos cereais mediu-se 10 mL de água para os tubos falcons de forma a hidratar, e colocou-se a agitar no multi reax durante 5 minutos. Seguidamente, colocou-se 10 mL da solução de extração de MeOH acidificado em todas as amostras e agitou-se no multi reax durante 15 minutos. Centrifugou-se durante 10 minutos a 5000 rpm e filtrou-se para o vial de 2 mL com uma seringa com um filtro com poros de dimensão de 0,45 μ m.

8.4 Condições cromatográficas

Para a quantificação de cloratos e percloratos, nas amostras de cereais, frutos e vegetais em estudo, utilizou-se o equipamento de cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS).

Na separação cromatográfica por UHPLC, inicialmente foi utilizada uma coluna Amide 3,5 μ L 4,6 x 150 mm da marca X Bridge, de forma a testar a sua seletividade para estes compostos, tendo-se concluído que não era ideal para a análise dos cloratos e percloratos, uma vez que não permitia a obtenção de picos cromatográficos com uma boa resolução. Dessa forma foi utilizada uma coluna de carbono grafite 100% poroso que permite separar compostos muito polares. O tipo de aquisição de transições utilizado foi o MRM (*multiple reaction monitoring*), as transições encontram-se apresentadas na tabela 8.5.

As condições cromatográficas utilizadas são apresentadas na tabela 8.5.

Tabela 8.5: Condições cromatográficas do método.

Parâmetros	Condições Cromatográficas		
Modo de ionização	ESI negativo		
Coluna	Hypercarb 2,1x100 mm (35005-102130) Marca: Thermo Fisher Scientific		
Temperatura do forno da coluna	40 °C		
Fase móvel A	1% de ácido acético em água + 5% de MeOH		
Fase móvel B	1% de ácido acético em MeOH		
Gradiente	Um gradiente foi aplicado a um fluxo de 0,2 mL/min e 100% de fase móvel A (0% de fase móvel B) no momento da injeção. Aos 4 minutos o fluxo foi ajustado para 0,4 mL/min. A fase móvel A foi aos 7 minutos deslocada para 70% (30% de fase móvel B), e esta composição foi mantida durante 1 minuto. De seguida a composição da fase móvel e o de fluxo foram reajustados às condições iniciais e mantidos assim durante aproximadamente 7 minutos de forma a reequilibrar a coluna.		
	Bomba B (%)	Fluxo (mL/min)	Tempo (min)
	0,00	0,2	0
	0,00	0,2	3
	0,00	0,4	4
	30,00	0,4	7
	0,00	0,4	8
	0,00	0,2	13
	0,00	0,2	15
Volume de injeção	25 µL		
Tempo de corrida	15 min		
Transições de massas	Cloratos: 83/67; 85/69 Percloratos: 99/83;101/85		
Detetor	MS/MS		
Bomba/Fluxo	Ver informação gradiente		
Modo de separação	Fase Reversa		

9. Resultados e discussão

Os resultados obtidos na implementação e validação do método para a determinação de percloratos e cloratos em frutos, vegetais e cereais por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS) serão apresentados de seguida e englobam os seguintes parâmetros de validação: gama de trabalho, linearidade, seletividade, limiares analíticos (LD e LQ), exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermédia), razões iónicas (Anexo 1) e as incertezas da medição.

A metodologia seguida teve por base o guia para a validação de pesticidas e contaminantes SANTE/11813/2017, da Comissão Europeia.

A implementação e validação do método foram realizadas nas seguintes matrizes: cenoura, pimento, ginja, uva, abóbora, tomate, brócolos, arroz e milho. No entanto devido à grande quantidade de resultados, apenas serão apresentados numa forma mais detalhada para a matriz cenoura.

9.1 Gama de trabalho e linearidade

Para a quantificação dos percloratos e cloratos em frutos, vegetais e cereais elaborou-se retas de calibração na própria matriz que se pretendia analisar (exemplo: foi feita reta em pimento quando se pretendia analisar pimentos). As retas de calibração em matriz foram comparadas com retas efetuadas em solvente (Anexo 2), de forma a se verificar quais seriam as mais apropriadas para a determinação de percloratos e cloratos, tendo-se optado pelas retas em matriz.

Após o estudo de qual seria a gama de trabalho mais adequada para a determinação destes analitos, nestas matrizes verificou-se que para os cereais, a gama de trabalho seria de: 0,00250 a 0,0500 µg/mL, equivalente a 0,0100 a 0,200 mg/kg, enquanto que para os frutos e vegetais seria: 0,00500 a 0,0500 µg/mL, equivalente a 0,0100 a 0,100 mg/kg.

A gama foi escolhida tendo em conta que o ponto de calibração mais baixo corresponde ao limite máximo de resíduo aceite por defeito para pesticidas na união europeia (0,0100 mg/kg). O extremo superior da gama foi escolhido tendo em conta as recomendações do guia SANTE (cerca de 10 vezes o limite inferior da gama).

O estudo da linearidade consistiu na elaboração de retas de calibração. Estas foram traçadas a partir de um mínimo de cinco pontos de calibração distintos, no caso dos frutos e vegetais, e de seis no caso dos cereais, de acordo com a gama de concentrações estipulada para os contaminantes em estudo. A seleção do ião quantificador foi determinada consoante a matriz, devido ao efeito de matriz ser diferente para cada transição iónica.

Nas tabelas 9.1 e 9.5 encontram-se representados os valores das concentrações dos padrões e respectivas áreas do pico (sinal), sem analito nativo, para a elaboração das retas de calibração do arroz (matriz representativa do grupo dos cereais) na determinação de percloratos e cloratos, respetivamente. Nas figuras 9.1 e 9.3 encontram-se representadas as retas de calibração do arroz para os percloratos e cloratos, respetivamente. Nas tabelas 9.3 e 9.7 e nas figuras 9.2 e 9.4, encontram-se os mesmos dados para a matriz cenoura, representativa dos produtos de frutos/vegetais.

Para a avaliação da linearidade recorreu-se à avaliação visual do gráfico acompanhada pelo cálculo do coeficiente de determinação (R^2), ao estudo dos residuais e ao teste de Grubbs.

Na tabela 9.9 e 9.10 encontram-se os coeficientes de determinação obtidos para as retas de calibração em matriz para a determinação dos percloratos e cloratos, respetivamente. Nas tabelas 9.2 e 9.6 estão representados os testes dos residuais e de grubbs para a matriz arroz, enquanto que nas tabelas 9.4 e 9.8 encontram-se os mesmos resultados para a cenoura.

As retas apresentam coeficientes de determinação entre 0,9976 e 0,9999. Estes valores cumprem o critério estipulado de $r > 0,9950$. Pode-se concluir, para todas as matrizes validadas, que no teste dos residuais, os pontos de calibração não apresentam desvios significativos, ou seja, estão dentro dos limites de aceitação estabelecidos ($\pm 20\%$ entre o valor obtido pela reta e o valor real do padrão em cada ponto de calibração) em todas as amostras estudadas (SANTE, 2017). No caso do teste de Grubbs, verifica-se que não existe valores aberrantes, pois, a um nível de confiança de 95%, o $G_{calc} < G_{crítico}$.

Através da avaliação visual, do coeficiente de correlação e do teste dos residuais conclui-se que todas as retas de calibração são lineares.

Os padrões de controlo utilizados para controlar a calibração e sensibilidade do equipamento, PC1 (extremo inferior da gama) e PC2 (extremo superior da gama), encontraram-se dentro dos critérios de aceitação ($\pm 20\%$) em todas as calibrações realizadas. Não foi possível introduzir os resultados obtidos nesta dissertação devido à grande quantidade de resultados.

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Tabela 9.1: Padrões da reta de calibração para a determinação dos percloratos no arroz e respectivas áreas dos picos cromatográficos da transição 99>83 do dia 27/08/18.

Pontos de calibração	Conc. (mg/kg)	Conc. (µg/mL)	Área do pico sem analito nativo
1	0,0100	0,00250	41835
2	0,0200	0,00500	90472
3	0,0400	0,0100	188995
4	0,100	0,0250	506399
5	0,160	0,0400	844714
6	0,200	0,0500	1068628

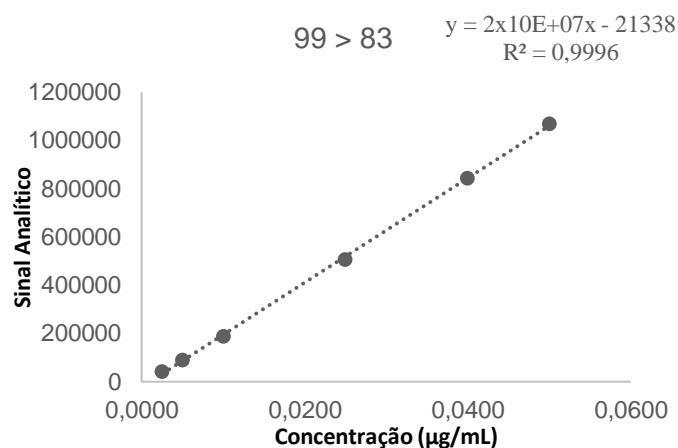


Figura 9.1: Reta de calibração para a determinação dos percloratos no arroz na gama de concentrações: 0,00250 a 0,0500 µg/mL, no dia 27/08/18.

Tabela 9.2: Testes dos Residuais e de Grubbs nos pontos de calibração da reta para a determinação de percloratos no arroz no dia 27/08/18.

Pontos de calibração	Teste dos Residuais (%)	Teste de Grubbs
1	117	0,98
2	103	0,86
3	97,1	0,62
4	97,5	0,12
5	100	0,91
6	101	1,43

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

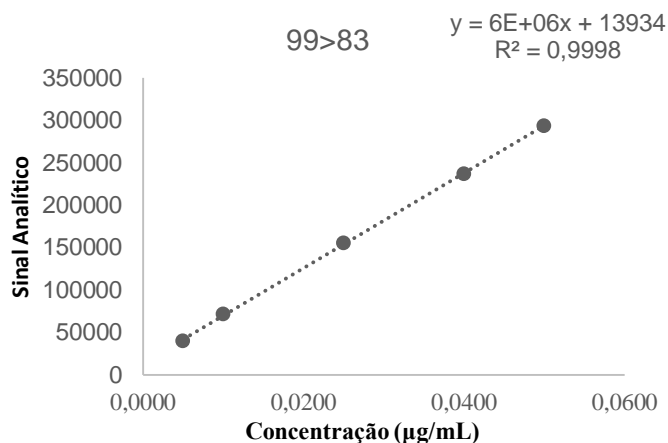


Figura 9.2: Reta de calibração para a determinação dos percloratos na cenoura na gama de concentrações 0,00500 a 0,0500 µg/mL, no dia 25/09/18.

Tabela 9.3: Padrões da reta de calibração para a determinação dos percloratos na cenoura e respetivas áreas dos picos cromatográficos da transição 99>83 do dia 25/09/18.

Pontos de calibração	Conc. (mg/kg)	Conc. (µg/mL)	Área do pico sem analito nativo
1	0,0100	0,00500	39865
2	0,0200	0,0100	71647
3	0,0500	0,0250	155482
4	0,0800	0,0400	237272
5	0,100	0,0500	293993

Tabela 9.4: Testes dos Residuais e de Grubbs nos pontos de calibração da reta para a determinação de percloratos na cenoura no dia 25/09/18.

Pontos de calibração	Teste dos Residuais (%)	Teste de Grubbs
1	92,5	1,11
2	103	0,82
3	101	0,04
4	99,6	0,72
5	99,9	1,25

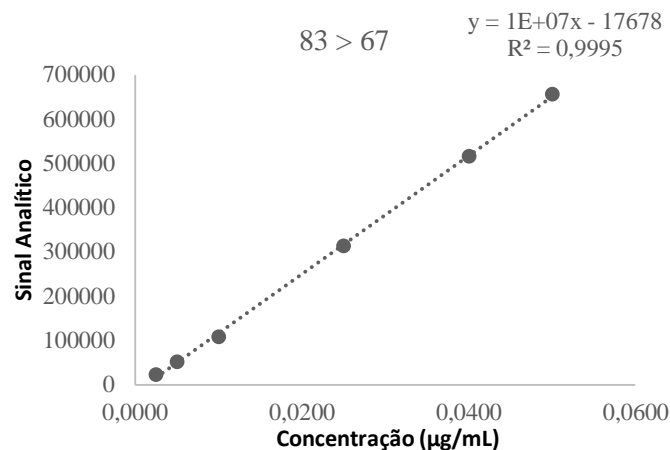


Figura 9.3: Reta de calibração para a determinação dos cloratos no arroz na gama de concentrações 0,00250 a 0,0500 µg/mL, no dia 27/08/18.

Tabela 9.5: Padrões da reta de calibração para a determinação dos cloratos no arroz e respectivas áreas dos picos cromatográficos da transição 83>67 do dia 27/08/18.

Pontos de calibração	Conc. (mg/kg)	Conc. (µg/mL)	Área do pico sem analito nativo
1	0,0100	0,00250	22536
2	0,0200	0,00500	52140
3	0,0400	0,0100	107262
4	0,100	0,0250	314040
5	0,160	0,0400	515644
6	0,200	0,0500	655899

Tabela 9.6: Testes dos Residuais e de Grubbs nos pontos de calibração da reta para a determinação de cloratos no arroz no dia 27/08/18.

Pontos de calibração	Teste dos Residuais (%)	Teste de Grubbs
1	120	0,97
2	104	0,85
3	93,3	0,64
4	99,1	0,14
5	99,6	0,90
6	100	1,43

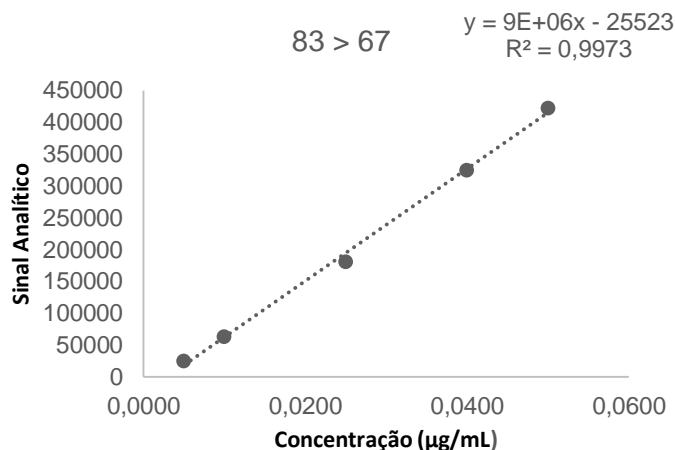


Figura 9.4: Reta de calibração para a determinação dos cloratos na cenoura na gama de concentrações 0,00500 a 0,0500 µg/mL, no dia 25/09/18.

Tabela 9.7: Padrões da reta de calibração para a determinação dos cloratos na cenoura e respetivas áreas dos picos cromatográficos da transição 83>67 do dia 25/09/18.

Pontos de calibração	Concentração (mg/kg)	Concentração (µg/mL)	Área do pico sem analito nativo
1	0,0100	0,00500	25960
2	0,0200	0,0100	63478
3	0,0500	0,0250	180967
4	0,0800	0,0400	325271
5	0,100	0,0500	422833

Tabela 9.8: Testes dos Residuais e de Grubbs nos pontos de calibração da reta para a determinação de cloratos na cenoura no dia 25/09/18.

Pontos de calibração	Teste dos Residuais (%)	Teste de Grubbs
1	117	1,05
2	101	0,83
3	93,7	0,13
4	99,5	0,72
5	102	1,29

Tabela 9.9: Equações das retas efetuadas em matriz para a determinação dos percloratos e respectivos coeficientes de determinação (R^2).

Percloratos					
Data	Matriz	Ião Quant.	Equação da Reta	Declive (m)	R^2
27/8/18	Tomate	101>85	$y = 6 \times 10^6 x + 22248$	5869022,5	0,9986
27/8/18	Arroz	99>83	$y = 2 \times 10^7 x - 21338$	21653344,6	0,9996
25/9/18	Arroz	99>83	$y = 1 \times 10^7 x - 4879,2$	14468807,8	0,9994
25/9/18	Cenoura	99>83	$y = 6 \times 10^6 x + 13934$	5604517,7	0,9998
25/9/18	Pimento	99>83	$y = 2 \times 10^7 x - 27464$	16856632	0,9983
25/9/18	Tomate	101>85	$y = 3 \times 10^6 x + 10403$	3412627,2	0,9981
25/9/18	Laranja	101>85	$y = 3 \times 10^6 x + 7401,0$	2800684,4	0,9991
25/9/18	Ginja	99>83	$y = 1 \times 10^7 x - 55251$	13723366	0,9992
7/11/18	Pimento	99>83	$y = 8 \times 10^6 x + 80,544$	7950648,3	0,9977
7/11/18	Uva	99>83	$y = 1 \times 10^7 x + 2878,0$	9727693,9	0,9989
7/11/18	Milho	99>83	$y = 1 \times 10^7 x - 1696,6$	9955712,8	0,9985
7/11/18	Cenoura	99>83	$y = 8 \times 10^6 x - 2279,0$	7780078,2	0,9985
7/11/18	Brócolos	99>83	$y = 1 \times 10^7 x - 5845,0$	12007784,4	0,9990
7/11/18	Abóbora	99>83	$y = 9 \times 10^6 x - 13674$	8553810,9	0,9978

Tabela 9.10: Equações das retas efetuadas em matriz para a determinação dos cloratos e respectivos coeficientes de determinação (R^2).

Cloratos					
Data	Matriz	Ião Quant.	Equação da Reta	Declive (m)	R^2
27/8/18	Tomate	83>67	$y = 9 \times 10^6 x - 8052,2$	9023122,5	0,9993
27/8/18	Arroz	83>67	$y = 1 \times 10^7 x - 17678$	13385574,7	0,9995
25/9/18	Arroz	83>67	$y = 1 \times 10^7 x - 7427,5$	10236384,8	0,9999
25/9/18	Cenoura	83>67	$y = 9 \times 10^6 x - 25523$	8816334	0,9973
25/9/18	Pimento	83>67	$y = 6 \times 10^6 x - 4526,7$	5744895,9	0,9990
25/9/18	Tomate	83>67	$y = 6 \times 10^6 x - 14422$	6192322,5	0,9983
25/9/18	Laranja	85>69,2	$y = 8 \times 10^6 x - 13613$	7894005,4	0,9991
25/9/18	Ginja	83>67	$y = 8 \times 10^6 x - 21961$	8363315,6	0,9991
7/11/18	Pimento	83>67	$y = 4 \times 10^6 x - 12950$	4438361,9	0,9991
7/11/18	Uva	83>67	$y = 6 \times 10^6 x - 18668$	6240863,3	0,9976
7/11/18	Milho	85>69,2	$y = 7 \times 10^6 x - 5263,0$	6871958,9	0,9998
7/11/18	Cenoura	83>67	$y = 3 \times 10^6 x - 9434,5$	3120326,5	0,9979
7/11/18	Brócolos	83>67	$y = 4 \times 10^6 x - 16572$	3532674,2	0,9997
7/11/18	Abóbora	85>69,2	$y = 1 \times 10^6 x - 5020,3$	1491110,2	0,9994

9.2 Especificidade e seletividade

A seletividade é um parâmetro fundamental na análise de compostos em cromatografia pois permite avaliar a capacidade do método de separar e identificar inequivocamente os compostos de interesse de outros compostos ou de possíveis interferentes. Assim sendo é necessário conseguir uma boa resolução entre os picos de interesse (os picos dos analitos deverão sair o mais separados possível) ou usar transições específicas de cada um deles.

Verificou-se que os cloratos e percloratos saíam completamente separados (Figura 9.5 e 9.6): tempo de retenção dos cloratos: 2,7 minutos; tempo de retenção dos percloratos: 6,3 minutos. Os tempos de retenção poderão variar ligeiramente de matriz para matriz, contudo são sempre controlados devido à preparação da reta de calibração e respetivos padrões de controlo na mesma matriz.

As transições (quantificadoras e qualificadoras) escolhidas (e específicas) para cada composto aliado ao fator de ambos os compostos não saírem sobrepostos cromatograficamente, consegue-se garantir a seletividade e especificidade do método.

Não houve interferentes de solvente na validação em todos os dias da análise que se realizaram e o branco teve um critério de aceitação de 3/10 do padrão mais baixo da reta de calibração.

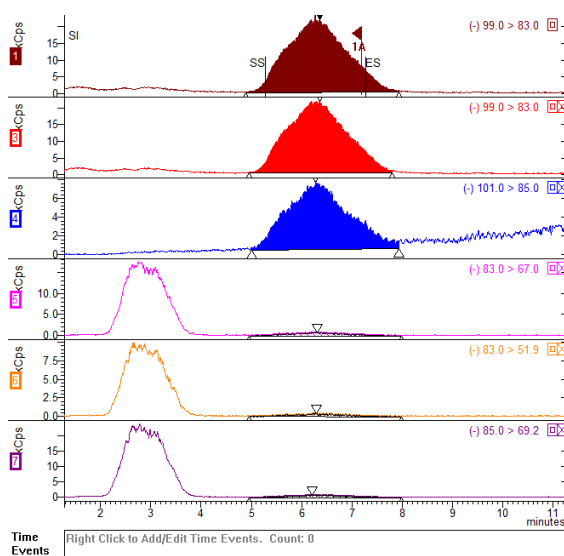


Figura 9.5: Cromatograma do padrão de controlo 2 (PC2) dos percloratos.

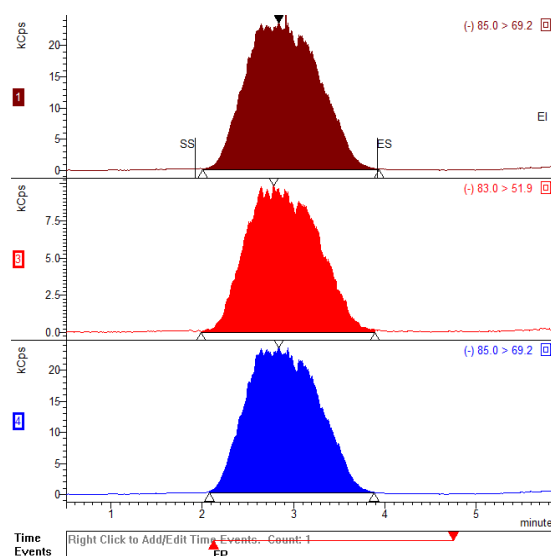


Figura 9.6: Cromatograma do padrão de controlo 2 (PC2) dos cloratos.

9.3 Limite de Detecção e Quantificação

Os limiares analíticos foram determinados através do declive da reta e do desvio padrão residual de acordo com as equações descritas anteriormente. Foi feita a confirmação experimental do LQ, fazendo-se recuperadas a este nível e verificando-se que estas cumpriam os critérios de aceitação.

Em todas as matrizes no qual a amostra utilizada para a validação não era isenta de cloratos e/ou percloratos foi descontado o valor da área da amostra antes da análise e validação.

Na tabela 9.11 e 9.12 encontram-se representados os limiares analíticos calculados a partir das retas de calibração para os percloratos e cloratos, respetivamente.

Assim, considerando o primeiro padrão das várias retas e os fatores do método conseguimos garantir um LQ de 0,0100 mg/kg cumprindo desta forma a recomendação da EFSA.

Tabela 9.11: Limiares analíticos para os percloratos nas diferentes matrizes.

Data	Matriz	Ião Quant.	Declive(m)	DPR	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
27/08/18	Tomate	101 > 85	5869022,5	4864,68	0,00274	0,00829
27/08/18	Arroz	99 > 83	21653344,6	9628,89	0,00147	0,00445
25/9/18	Arroz	99 > 83	14468807,8	7845,02	0,00179	0,00542
25/9/18	Cenoura	99>83	5604517,7	1821,52	0,00107	0,00325
25/9/18	Pimento	99 > 83	16856632	14681,23	0,00287	0,00871
25/9/18	Tomate	101 > 85	3412627,2	3291,20	0,00318	0,00964
25/9/18	Laranja	101 > 85	2800684,4	1812,88	0,00213	0,00647
25/9/18	Ginja	99 > 83	13723366	8797,00	0,00211	0,00641
7/11/18	Pimento	99 > 83	7950648,3	8376,79	0,00348	0,0105
7/11/18	Uva	99 > 83	9727693,9	7179,70	0,00243	0,00738
7/11/18	Milho	99 > 83	9955712,8	9441,60	0,00313	0,00948
7/11/18	Cenoura	99 > 83	7780078,2	6582,10	0,00279	0,00846
7/11/18	Brócolos	99 > 83	12007784,4	8418,09	0,00231	0,00701
7/11/18	Abóbora	99 > 83	8553810,9	8799,55	0,00339	0,0103

Tabela 9.12: Limiares analíticos para os cloratos nas diferentes matrizes.

Data	Matriz	Ião Quant.	Declive(m)	DPR	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
27/08/18	Tomate	83 > 67	9023122,45	5157,15	0,00189	0,00572
27/08/18	Arroz	83 > 67	13385574,7	6419,31	0,00158	0,00480
25/9/18	Arroz	83 > 67	10236384,8	2200,41	0,000709	0,00215
25/9/18	Cenoura	83 > 67	8816334,01	10157,0	0,00380	0,0115
25/9/18	Pimento	83 > 67	5744895,92	3953,04	0,00227	0,00688
25/9/18	Tomate	83 > 67	6192322,45	5648,01	0,00301	0,00912
25/9/18	Laranja	85 > 69,2	7894005,44	5134,63	0,00215	0,00650
25/9/18	Ginja	83 > 67	8363315,65	5578,00	0,00220	0,00667
7/11/18	Pimento	83 > 67	4438361,9	3022,12	0,00225	0,00681
7/11/18	Uva	83 > 67	6240863,27	6812,07	0,00360	0,0109
7/11/18	Milho	85 > 69,2	6871958,9	2045,41	0,000982	0,00298
7/11/18	Cenoura	83 > 67	3120326,53	3163,02	0,00335	0,0101
7/11/18	Brócolos	83 > 67	3532674,15	1256,49	0,00117	0,00356
7/11/18	Abóbora	85 > 69,2	1491110,2	819,040	0,00181	0,00549

9.4 Exatidão

A exatidão do método cromatográfico foi avaliada através de ensaios de recuperação.

Os valores de recuperação baseiam-se na divisão do valor da concentração obtida no ensaio pelo valor teórico adicionado. O critério de aceitação usado foi de: 70 a 120 %, descrito no guia, SANTE (2017).

Nas tabelas 9.13 e 9.14, encontram-se os valores obtidos da percentagem de recuperação de 0,0100 e 0,0300 mg/kg de percloratos e cloratos, respetivamente, na matriz cenoura.

No caso da taxa de recuperação de percloratos para a cenoura foi entre os 82,5 e os 119 % enquanto que nos cloratos foi entre 80,5 e 98,1 %. Dessa forma pode-se concluir que os valores são aceitáveis.

Os valores de recuperação de cloratos nos brócolos excederam o limite de aceitação, tendo uma média de taxa de recuperação de 133 % (Tabela 9.16). A taxa de recuperação para a concentração de 0,0100 mg/kg foi de 118 a 149 %, enquanto que para a concentração de 0,0300 mg/kg foi de 123 a 126 %. Esta recuperação elevada deve-se ao facto de a amostra estar positiva em relação a este analito, tendo uma concentração de 0,0690 mg/kg de cloratos, sendo que fortificando a níveis mais baixos (LQ) poderá haver influência da concentração que a amostra já possui.

Em relação às amostras de cereais, o arroz e o milho, tiveram recuperações aceitáveis, para ambos os analitos em estudo. Nos frutos e vegetais (tomate, abóbora, uva, laranja, pimento)

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

a taxa de recuperação de cloratos e percloratos encontra-se dentro dos critérios de aceitação (Tabelas 9.15 e 9.16).

Pode-se verificar na tabela 9.15 e 9.16, que em todas as matrizes em estudo o coeficiente de variação (CV) encontra-se abaixo de 20%, cumprindo assim também este critério de aceitação.

De uma maneira geral os resultados para os compostos em análise foram relativamente satisfatórios, cumprido todos os critérios de aceitação de validação.

Tabela 9.13: Ensaios de recuperação com 0,0100 e 0,0300 mg/kg de percloratos na cenoura.

Data	Matriz	Ião Quant.	Conc. Adicionada (mg/kg)	Conc. de analito nativo na amostra (mg/kg)	Conc. obtida da amostra com analito nativo (mg/kg)	Conc. obtida da amostra sem analito nativo (mg/kg)	Rec. %
25/09/18	Cenoura	99>83	0,0100	0	0,00825	0,00825	82,5
				0	0,00861	0,00861	86,1
				0	0,00870	0,00870	87,0
				0	0,0103	0,0103	103
				0	0,0106	0,0106	103
			0,0300	0	0,0357	0,0357	119
				0	0,0327	0,0327	109
				0	0,0345	0,0345	115
				0	0,0317	0,0317	105
				0	0,0348	0,0348	116
7/11/18		99>83	0,0100	0	0,0101	0,0101	101
				0	0,00933	0,00933	93,2
				0	0,00866	0,00866	86,6
				0	0,00998	0,00998	99,8
				0	0,00981	0,00981	98,1
			0,0300	0	0,0293	0,0293	97,5
				0	0,0276	0,0276	92,0
				0	0,0283	0,0283	94,2
				0	0,0276	0,0276	91,9
	0			0,0270	0,0270	90,1	
Média						98,5	
Desvio Padrão						10,5	
CV%						10,7	

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Tabela 9.14: Ensaios de recuperação com 0,0100 e 0,0300 mg/kg de cloratos na cenoura.

Data	Matriz	Ião Quant.	Conc. Adicionada (mg/kg)	Conc. de analito nativo na amostra (mg/kg)	Conc. obtida da amostra com analito nativo (mg/kg)	Conc. obtida da amostra sem analito nativo (mg/kg)	Rec. %
25/09/18	Cenoura	83>67	0,0100	0	0,00928	0,00928	92,8
				0	0,00923	0,00923	92,4
				0	0,00966	0,00966	96,6
				0	0,00919	0,00919	91,9
				0	0,00906	0,00906	90,6
			0,0300	0	0,0293	0,0293	97,6
				0	0,0290	0,0290	96,8
				0	0,0292	0,0292	97,5
				0	0,0294	0,0294	98,1
				0	0,0286	0,0286	95,2
7/11/18	83>67	0,0100	0,0133	0,0153	0,00805	80,5	
			0,0133	0,0158	0,00855	85,5	
			0,0133	0,0154	0,00811	81,1	
			0,0133	0,0155	0,00817	81,7	
			0,0133	0,0158	0,00849	84,9	
		0,0300	0,0133	0,0344	0,0271	90,4	
			0,0133	0,0328	0,0255	85,0	
			0,0133	0,0341	0,0268	89,3	
			0,0133	0,0347	0,0274	91,4	
			0,0133	0,0351	0,0278	92,8	
Média						90,6	
Desvio Padrão						5,7	
CV%						6,3	

Tabela 9.15: Resumo dos resultados obtidos no ensaio de recuperação de percloratos nas matrizes.

Data	Matriz	Ião Quant.	Rec. Média %	Desvio Padrão	CV %
27/08/18 25/09/18	Arroz	99>83	92,2	11,3	12,3
27/08/18 25/09/18	Tomate	101>85	97,7	11,2	11,5
25/09/18 7/11/18	Cenoura	99 > 83	98,5	10,5	10,7
25/09/18 7/11/18	Pimento	99 > 83	89,2	6,9	7,7
25/09/18	Laranja	101>85	79,3	6,5	8,7
25/09/18	Ginja	99 > 83	97,2	12,6	12,9
7/11/18	Milho	99>83	102	10,7	10,6
7/11/18	Uva	99>83	100	4,5	4,5
7/11/18	Brócolos	99>83	110	7,1	6,5
7/11/18	Abóbora	99>83	98,8	3,7	3,7

Tabela 9.16: Resumo dos resultados obtidos no ensaio de recuperação de cloratos nas matrizes.

Data	Matriz	Ião Quant.	Rec. Média %	Desvio Padrão	CV %
27/08/18 25/09/18	Arroz	83>67	94,4	9,5	10,1
27/08/18 25/09/18	Tomate	83>67	99,4	10,6	10,6
25/09/18 7/11/18	Cenoura	83>67	90,6	5,7	6,3
25/09/18 7/11/18	Pimento	83>67	103	8,4	8,1
25/09/18	Laranja	85>69,2	102	12,6	12,3
25/09/18	Ginja	83>67	86,3	3,3	3,8
7/11/18	Milho	85>69,2	91,3	14,1	15,4
7/11/18	Uva	83>67	101	8,5	8,4
7/11/18	Brócolos	83>67	133	13,4	10,0
7/11/18	Abóbora	85>69,2	85,0	6,4	7,6

9.5 Precisão

9.5.1 Repetibilidade

Para a validação deste parâmetro foram usadas duas matrizes de cereais, (o milho e o arroz) e 8 matrizes de frutos e vegetais (tomate, cenoura, ginja, laranja, pimento, abóbora, brócolos e uva).

A determinação da repetibilidade para os cereais foi efetuada fazendo no mínimo cinco réplicas do ensaio de fortificação a 0,0100 mg/kg e cinco réplicas do ensaio de fortificação a 0,0200mg/kg de cloratos e percloratos. No caso dos frutos e vegetais a repetibilidade foi determinada efetuando-se no mínimo cinco réplicas do ensaio de fortificação a 0,0100 mg/kg e cinco réplicas do ensaio de fortificação a 0,0300 mg/kg de cloratos e percloratos. O pimento (25/09/18) foi fortificado com 0,0200 mg/kg de percloratos e cloratos, isto ocorreu devido a um erro na fortificação destas amostras.

Na tabela 9.17 e 9.18 encontra-se os resultados obtidos para o limite de repetibilidade da amostra de cenoura com percloratos e nas tabelas 9.19 e 9.20 encontram-se os resultados obtidos para os cloratos.

Nas tabelas 9.21 e 9.22, 9.23 e 9.24 estão representados o desvio padrão, a média e o coeficiente de variação de todas as amostras usadas para a validação deste parâmetro, para os percloratos e cloratos respectivamente. Pode-se verificar que em todas as amostras de frutos, vegetais e cereais o coeficiente de variação (CV) é inferior a 20%, que é o critério de aceitação (SANTE, 2017).

Tabela 9.17: Análise dos resultados obtidos para o limite de repetibilidade para a matriz cenoura fortificada com 0,0100 mg/kg de percloratos no dia 25/09/18.

Matriz	Conc. Esperada (mg/kg)	Conc. Obtida (mg/kg)
Cenoura	0,0100	0,00825
		0,00861
		0,00870
		0,0103
		0,0103
	Desvio Padrão	0,00100
	Média	0,00922
	N	5
	Repetibilidade	0,00274
	Repetibilidade %	29,7
	CV(%)	10,6

Tabela 9.18: Análise dos resultados obtidos para o limite de repetibilidade para a matriz cenoura fortificada com 0,0300 mg/kg de percloratos no dia 25/09/18.

Matriz	Conc. Esperada (mg/kg)	Conc. Obtida (mg/kg)
Cenoura	0,0300	0,0357
		0,0327
		0,0345
		0,0316
		0,0348
	Desvio Padrão	0,0017
	Média	0,0339
	N	5
	Repetibilidade	0,00467
	Repetibilidade %	13,8
	CV(%)	4,93

Tabela 9.19: Análise dos resultados obtidos para o limite de repetibilidade para a matriz cenoura fortificada com 0,0100 mg/kg de cloratos no dia 25/09/18.

Matriz	Conc. Esperada (mg/kg)	Conc. Obtida (mg/kg)
Cenoura	0,0100	0,00928
		0,00923
		0,00966
		0,00919
		0,00906
	Desvio Padrão	0,00022
	Média	0,00929
	N	5
	Repetibilidade	0,00063
	Repetibilidade %	6,74
	CV(%)	2,41

Tabela 9.20: Análise dos resultados obtidos para o limite de repetibilidade para a matriz cenoura fortificada com 0,0300 mg/kg de cloratos no dia 25/09/18.

Matriz	Conc. Esperada (mg/kg)	Conc. Obtida (mg/kg)
Cenoura	0,0300	0,0293
		0,0290
		0,0292
		0,0294
		0,0286
	Desvio Padrão	0,0003
	Média	0,0291
	N	5
	Repetibilidade	0,00094
	Repetibilidade %	3,23
	CV(%)	1,15

Tabela 9.21: Análise dos resultados obtidos para o limite de repetibilidade das matrizes em estudo, fortificadas com 0,0100 mg/kg de percloratos.

Data	Matriz	Ião Quant.	Conc. Teórica (mg/kg)	Desvio Padrão	Média	N	Rep.	Rep. %	CV %
27/08/18	Arroz	99>83	0,0100	0,0005	0,0103	7	0,00139	13,5	4,84
27/08/18	Tomate	101>85	0,0100	0,00019	0,00979	7	0,00052	5,32	1,90
25/09/18	Cenoura	99>83	0,0100	0,00098	0,00922	5	0,00274	29,7	10,6
25/09/18	Pimento	99>83	0,0100	0,00040	0,00943	5	0,00112	11,9	4,25
25/09/18	Tomate	101>85	0,0100	0,00111	0,00862	5	0,00312	36,1	12,9
25/09/18	Laranja	101>85	0,0100	0,00065	0,00808	5	0,00181	22,4	8,01
25/09/18	Ginja	99>83	0,0100	0,0003	0,0109	5	0,00070	6,47	2,31
25/09/18	Arroz	99>83	0,0100	0,0004	0,0103	5	0,00120	11,7	4,19
07/11/18	Pimento	99>83	0,0100	0,00024	0,00890	5	0,00068	7,64	2,73
07/11/18	Milho	99>83	0,0100	0,00054	0,00923	5	0,00151	16,3	5,84
07/11/18	Cenoura	99>83	0,0100	0,00060	0,00958	5	0,00167	17,5	6,24
07/11/18	Uva	99>83	0,0100	0,0005	0,0101	5	0,00138	13,7	4,89
07/11/18	Brócolos	99>83	0,0100	0,0002	0,0116	5	0,00054	4,64	1,66
07/11/18	Abóbora	99>83	0,0100	0,0002	0,0102	5	0,00049	4,80	1,71

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Tabela 9.22: Análise dos resultados obtidos para os limites de repetibilidade das matrizes em estudo, fortificadas com 0,0200 mg/kg (cereais) e 0,0300 mg/kg (frutos e vegetais) de percloratos.

Data	Matriz	Ião Quant.	Conc. Teórica (mg/kg)	Desvio Padrão	Média	N	Rep.	Rep. %	CV %
27/08/18	Arroz	99>83	0,0200	0,0005	0,0157	7	0,00132	8,38	2,99
27/08/18	Tomate	101>85	0,0300	0,0012	0,0332	7	0,00347	10,5	3,73
25/09/18	Cenoura	99>83	0,0300	0,0017	0,0339	5	0,00467	13,8	4,93
25/09/18	Pimento	99>83	0,0200	0,0006	0,0188	5	0,00161	8,54	3,05
25/09/18	Tomate	101>85	0,0300	0,0021	0,0273	5	0,00590	21,6	7,73
25/09/18	Laranja	101>85	0,0300	0,0021	0,0234	5	0,00574	24,6	8,78
25/09/18	Ginja	99>83	0,0300	0,0002	0,0256	5	0,00063	2,47	0,88
25/09/18	Arroz	99>83	0,0200	0,0005	0,0179	5	0,00138	7,70	2,75
07/11/18	Pimento	99>83	0,0300	0,0009	0,0238	5	0,00239	10,1	3,59
07/11/18	Milho	99>83	0,0200	0,0007	0,0222	5	0,00207	9,34	3,34
07/11/18	Cenoura	99>83	0,0300	0,0009	0,0279	5	0,00239	8,54	3,05
07/11/18	Uva	99>83	0,0300	0,0014	0,0301	5	0,00379	12,6	4,50
07/11/18	Brócolos	99>83	0,0300	0,0008	0,0309	5	0,00234	7,56	2,70
07/11/18	Abóbora	99>83	0,0300	0,0006	0,0287	5	0,00162	5,63	2,01

Tabela 9.23: Análise de resultados obtidos para o limite de repetibilidade das matrizes em estudo, fortificadas com 0,0100 mg/kg cloratos.

Data	Matriz	Ião Quant.	Conc. Teórica (mg/kg)	Desvio Padrão	Média	N	Rep.	Rep. %	CV %
27/08/18	Arroz	83>67	0,0100	0,0006	0,0104	7	0,00161	15,5	5,53
27/08/18	Tomate	83>67	0,0100	0,00037	0,00915	7	0,00103	11,2	4,01
25/09/18	Cenoura	83>67	0,0100	0,00022	0,00929	5	0,00063	6,74	2,41
25/09/18	Pimento	83>67	0,0100	0,00046	0,00996	5	0,00130	13,0	4,65
25/09/18	Tomate	83>67	0,0100	0,0002	0,0117	5	0,00048	4,11	1,47
25/09/18	Laranja	85>69,2	0,0100	0,0005	0,0114	5	0,00138	12,1	4,32
25/09/18	Ginja	83>67	0,0100	0,00027	0,00838	5	0,00076	9,12	3,26
25/09/18	Arroz	83>67	0,0100	0,00044	0,00823	5	0,00122	14,9	5,31
07/11/18	Pimento	83>67	0,0100	0,00010	0,00920	5	0,00027	2,94	1,05
07/11/18	Milho	85>69,2	0,0100	0,0005	0,0105	5	0,00151	16,3	5,84
07/11/18	Cenoura	83>67	0,0100	0,00023	0,00828	5	0,00064	7,69	2,75
07/11/18	Uva	83>67	0,0100	0,00010	0,00943	5	0,00029	3,03	1,08
07/11/18	Brócolos	83>67	0,0100	0,0014	0,0143	5	0,00386	27,0	9,64
07/11/18	Abóbora	85>69,2	0,0100	0,00006	0,00909	5	0,00017	1,82	0,65

Tabela 9.24: Análise dos resultados obtidos para os limites de repetibilidade das matrizes em estudo, fortificadas com 0,0200 mg/kg (cereais) e 0,0300 mg/kg (frutos e vegetais) de cloratos.

Data	Matriz	Ião Quant.	Conc. Teórica (mg/kg)	Desvio Padrão	Média	N	Rep.	Rep. %	CV %
27/08/18	Arroz	83>67	0,0200	0,0012	0,0191	7	0,00343	17,9	6,40
27/08/18	Tomate	83>67	0,0300	0,0017	0,0280	7	0,00485	17,31	6,18
25/09/18	Cenoura	83>67	0,0300	0,0003	0,0291	5	0,00094	3,23	1,15
25/09/18	Pimento	83>67	0,0200	0,0004	0,0227	5	0,00116	5,10	1,82
25/09/18	Tomate	83>67	0,0300	0,0010	0,0304	5	0,00274	9,01	3,22
25/09/18	Laranja	85>69,2	0,0300	0,0007	0,0273	5	0,00207	7,58	2,71
25/09/18	Ginja	83>67	0,0300	0,0004	0,0266	5	0,00104	3,92	1,40
25/09/18	Arroz	83>67	0,0200	0,0008	0,0174	5	0,00236	13,6	4,85
07/11/18	Pimento	83>67	0,0300	0,0002	0,0316	5	0,00059	1,88	0,67
07/11/18	Milho	85>69,2	0,0200	0,0007	0,0234	5	0,00207	9,34	3,34
07/11/18	Cenoura	83>67	0,0300	0,0010	0,0269	5	0,00250	9,29	3,32
07/11/18	Uva	83>67	0,0300	0,0020	0,0324	5	0,00562	17,4	6,20
07/11/18	Brócolos	83>67	0,0300	0,0003	0,0374	5	0,00096	2,58	0,92
07/11/18	Abóbora	85>69,2	0,0300	0,0007	0,0237	5	0,00207	8,71	3,11

9.5.2 Precisão intermédia

A precisão intermédia é importante para a verificação da variabilidade de resultados num laboratório.

Na validação da precisão intermédia foram testados no caso dos cereais, o arroz e no caso dos frutos e vegetais, o tomate, a cenoura e o pimento. De modo a determinar a precisão intermédia, foram utilizados os ensaios de fortificação em condições de repetibilidade, de cada matriz em diferentes dias, com pelo menos 10 determinações, pelo mesmo analista. Neste caso a condição que variou foi o dia do ensaio. Note-se que não foram validados em precisão intermédias as matrizes laranja, ginja, milho, uva, brócolos e abóbora devido à falta de disponibilidade de equipamento, contudo com os dados de repetibilidade e restantes parâmetros permite a implementação do método para estas matrizes.

A matriz pimento, neste parâmetro, não foi validada para os ensaios de fortificação de 0,0300 mg/kg, devido à diferença de níveis de fortificação entre os dois dias (deveu-se a erro na fortificação da amostra).

Os resultados da avaliação da precisão intermédia de percloratos e cloratos, para a amostra de cenoura pode-se observar nas tabelas 9.25 e 9.26; 9.27 e 9.28 respetivamente.

Tabela 9.25: Análise dos resultados obtidos para a precisão intermédia para a matriz cenoura fortificada com 0,0100 mg/kg de percloratos.

Data	Matriz	Conc. Esperada (mg/kg)	Conc. Obtida (mg/kg)
25/09/18	Cenoura	0,0100	0,00825
			0,00861
			0,00870
			0,0103
			0,0103
07/11/18	Cenoura	0,0100	0,0101
			0,00933
			0,00866
			0,0998
			0,00981
		Desvio Padrão	0,00079
		Média	0,00940
		N	10
		Precisão intermédia	0,00221
		Precisão intermédia %	23,5
		CV (%)	8,38

Tabela 9.26: Análise dos resultados obtidos para a precisão intermédia para a matriz cenoura fortificada com 0,0300 mg/kg de percloratos.

Data	Matriz	Conc. Esperada (mg/kg)	Conc. Obtida (mg/kg)
25/09/18	Cenoura	0,0300	0,0357
			0,0327
			0,0345
			0,0316
			0,0348
07/11/18	Cenoura	0,0300	0,0293
			0,0276
			0,0283
			0,0276
			0,0270
		Desvio Padrão	0,0034
		Média	0,0309
		N	10
		Precisão intermédia	0,00943
		Precisão intermédia %	30,5
		CV (%)	10,9

Tabela 9.27: Análise dos resultados obtidos para a precisão intermédia para a matriz cenoura fortificada com 0,0100 mg/kg de cloratos.

Data	Matriz	Conc. Esperada (mg/kg)	Conc. Obtida (mg/kg)
25/09/18	Cenoura	0,0100	0,00928
			0,00923
			0,00966
			0,00919
			0,00906
07/11/18	Cenoura	0,0100	0,00805
			0,00855
			0,00811
			0,00817
			0,00842
		Desvio Padrão	0,00057
		Média	0,00878
		N	10
		Precisão intermédia	0,00160
		Precisão intermédia %	18,3
		CV (%)	6,53

Tabela 9.28: Análise dos resultados obtidos para a precisão intermédia para a matriz cenoura fortificada com 0,0300 mg/kg de cloratos.

Data	Matriz	Conc. Esperada (mg/kg)	Conc. Obtida (mg/kg)
25/09/18	Cenoura	0,0300	0,0293
			0,0290
			0,0292
			0,0294
			0,0286
07/11/18	Cenoura	0,0300	0,0271
			0,0255
			0,0268
			0,0274
			0,0278
		Desvio Padrão	0,0013
		Média	0,0280
		N	10
		Precisão intermédia	0,00366
		Precisão intermédia %	13,0
		CV (%)	4,66

Considera-se conforme a análise de precisão intermédia se o coeficiente de variação for inferior a 20 % (Sante, 2017). Observando os resultados obtidos nas tabelas 9.29 e 9.30, resultados da precisão intermédia para os percloratos, verificou-se que a percentagem de CV tanto para as amostras de cereais como para as de frutos e vegetais, foram inferiores a esse critério.

Em relação aos resultados da precisão intermédia para os cloratos, tabelas 9.31 e 9.32 constata-se que cumprem o critério de aceitação, sendo o CV % inferior a 20% em todas as matrizes.

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Tabela 9.29: Análise dos resultados obtidos para a precisão intermédia das matrizes em estudo, fortificadas com 0,0100 mg/kg.de percloratos.

Data	Matriz	Ião Quant.	Conc. Teórica (mg/kg)	Desvio Padrão	Média	N	Precisão intermédia	Precisão intermédia %	CV %
27/08/18 25/09/18	Arroz	99>83	0,0100	0,0005	0,0103	12	0,00127	12,4	4,42
27/08/18 25/09/18	Tomate	101>85	0,0100	0,00091	0,00930	12	0,00255	27,4	9,79
25/09/18 7/11/18	Cenoura	99>83	0,0100	0,00079	0,00940	10	0,00221	23,5	8,38
25/09/18 7/11/18	Pimento	99>83	0,0100	0,00042	0,00917	10	0,00117	12,7	4,55

Tabela 9.30: Análise dos resultados obtidos para a precisão intermédia das matrizes em estudo fortificadas com 0,0200 mg/kg (cereais) e 0,0300 mg/kg (frutos e vegetais) de percloratos.

Data	Matriz	Ião Quant.	Conc. Teórica (mg/kg)	Desvio Padrão	Média	N	Precisão intermédia	Precisão intermédia %	CV %
27/08/18 25/09/18	Arroz	99>83	0,0200	0,0012	0,0167	12	0,00345	20,7	7,39
27/08/18 25/09/18	Tomate	101>85	0,0300	0,0034	0,0307	12	0,00960	31,2	11,2
25/09/18 7/11/18	Cenoura	99 > 83	0,0300	0,0034	0,0309	10	0,00943	30,5	10,9

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Tabela 9.31. Análise dos resultados obtidos para a precisão intermédia das matrizes em estudo fortificadas com 0,0100 mg/kg de cloratos.

Data	Matriz	Ião Quant.	Conc. Teórica (mg/kg)	Desvio Padrão	Média	N	Precisão intermédia	Precisão intermédia %	CV %
27/08/18 25/09/18	Arroz	83>67	0,0100	0,00117	0,00979	12	0,00326	33,5	12,0
27/08/18 25/09/18	Tomate	83>67	0,0100	0,0013	0,0102	12	0,00374	36,7	13,10
25/09/18 7/11/18	Cenoura	83>67	0,0100	0,00057	0,00878	10	0,00160	18,3	6,53
25/09/18 7/11/18	Pimento	83>67	0,0100	0,00051	0,00958	10	0,00142	14,9	5,31

Tabela 9.32. Análise dos resultados obtidos para a precisão intermédia das matrizes em estudo fortificadas com 0,0200 mg/kg (cereais) e 0,0300 mg/kg (frutos e vegetais) de cloratos.

Data	Matriz	Ião Quant.	Conc. Teórica (mg/kg)	Desvio Padrão	Média	N	Precisão intermédia	Precisão intermédia %	CV %
27/08/18 25/09/18	Arroz	83>67	0,0200	0,0014	0,0184	12	0,00385	20,9	7,47
27/08/18 25/09/18	Tomate	83>67	0,0300	0,0019	0,0290	12	0,00526	18,1	6,48
25/09/18 7/11/18	Cenoura	83>67	0,0300	0,0013	0,0280	10	0,00366	13,0	4,66

9.5.2.1 Controlo de duplicados

De forma a garantir o controlo de qualidade do método, foram analisados os duplicados em cada um dos dias em condições de repetibilidade ou precisão intermédia, utilizando os dados dos ensaios de fortificação, ou seja foram efetuados duplicados das amostras recuperadas.

No caso das matrizes da cenoura, pimento, tomate e arroz foram efetuados ensaios de duplicados num dia e repetiu-se o ensaio num dia diferente. De forma a obter resultados mais robustos e representativos da realidade, compilaram-se os resultados obtidos dos dois dias.

Para as matrizes uva, ginja, abóbora, brócolos e milho apenas foram efetuados ensaios de recuperação num único dia.

As tabelas 9.33 e 9.34 representam o controlo dos duplicados dos percloratos e cloratos da cenoura, respetivamente.

Nas tabelas 9.35 e 9.36 pode-se observar o resumo da análise do controlo dos duplicados para os percloratos e cloratos das amostras em estudo, respetivamente.

Ao analisar os dados, é possível concluir que as condições do método permitem alcançar bons resultados, uma vez que a amplitude relativa é inferior a 20% para todas as matrizes em estudo. Estabeleceu-se como critério de aceitação 20% para os duplicados, uma vez que este critério tem de estar de acordo com a repetibilidade do método (SANTE, 2017).

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Tabelas 9.33: Controlo dos duplicados na matriz cenoura fortificada com 0,0100 e 0,0300 mg/kg de percloratos.

Data	Matriz	Conc.	Réplica 1 (mg/kg)	Réplica 2 (mg/kg)	Média	Ampl. Absoluta	Ampl. Relativa (%)
25/09/18	Cenoura	0,0100	0,00825	0,00915	0,00870	0,001	10,4
			0,00861	0,00980	0,00920	0,001	12,9
			0,00870	0,00981	0,00926	0,001	11,9
			0,0103	0,00900	0,00965	0,001	13,5
		0,0300	0,0357	0,0345	0,0351	0,001	3,50
			0,0327	0,0317	0,0322	0,001	2,87
			0,0345	0,0335	0,0340	0,001	3,21
			0,0317	0,0300	0,0308	0,002	5,34
07/11/18		0,0100	0,0101	0,00956	0,00985	0,001	5,80
			0,00933	0,00843	0,00888	0,001	10,1
			0,00866	0,00995	0,00930	0,001	13,9
			0,00998	0,00951	0,00974	0,000	4,78
		0,0300	0,0293	0,0332	0,0312	0,004	12,6
			0,0276	0,0302	0,0289	0,003	8,87
			0,0283	0,0302	0,0292	0,002	6,48
			0,0276	0,0315	0,0295	0,004	13,2
S (amp. rel.)						4,09	
Média (amp. rel.)						9,49	

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Tabelas 9.34: Controlo dos duplicados na matriz cenoura fortificada com 0,0100 e 0,0300 mg/kg de cloratos.

Data	Matriz	Conc.	Réplica 1 (mg/kg)	Réplica 2 (mg/kg)	Média	Ampl. Absoluta	Ampl. Relativa (%)
25/09/18	Cenoura	0,0100	0,00928	0,0101	0,00969	0,001	8,43
			0,00923	0,0102	0,00970	0,001	9,64
			0,00966	0,00998	0,00982	0,000	3,28
			0,00919	0,0102	0,00969	0,001	10,4
		0,0300	0,0293	0,0303	0,0298	0,001	3,42
			0,0291	0,0305	0,0298	0,001	5,02
			0,0292	0,0294	0,0293	0,000	0,760
			0,0294	0,0302	0,0298	0,001	2,53
07/11/18		0,0100	0,00805	0,00913	0,00859	0,001	12,5
			0,00855	0,00905	0,00880	0,001	5,70
			0,00811	0,00914	0,00863	0,001	11,9
			0,00817	0,00900	0,00859	0,001	9,63
		0,0300	0,0271	0,0290	0,0281	0,002	6,68
			0,0255	0,0291	0,0273	0,004	13,2
			0,0268	0,0295	0,0281	0,003	9,47
			0,0274	0,0296	0,0285	0,002	7,67
S (amp. rel)						3,78	
Média (amp. rel)						8,05	

Tabela 9.35: Análise dos resultados dos ensaios em duplicado das matrizes em estudo para os percloratos.

Data	Amostra	Ião Quant.	S(amplitude relativa)	Média da amplitude relativa
27/08/18 25/09/18	Arroz	99>83	2,53	3,77
27/08/18 25/09/18	Tomate	101>85	8,29	3,05
25/09/18 7/11/18	Cenoura	99>83	4,09	9,49
25/09/18 7/11/18	Pimento	99>83	3,07	3,00
25/09/18	Laranja	101>85	4,35	7,08
25/09/18	Ginja	99>83	1,78	1,46
7/11/18	Milho	99>83	1,81	4,54
7/11/18	Uva	99>83	1,64	3,74
7/11/18	Brócolos	99>83	2,21	2,61
7/11/18	Abóbora	99>83	1,64	1,75

Tabela 9.36: Análise dos resultados dos ensaios em duplicado das matrizes em estudo para os cloratos.

Data	Amostra	Ião Quant.	S(amplitude Relativa)	Média da amplitude relativa
27/08/18 25/09/18	Arroz	83>67	4,13	5,55
27/08/18 25/09/18	Tomate	83>67	3,57	3,31
25/09/18 7/11/18	Cenoura	83>67	3,78	8,05
25/09/18 7/11/18	Pimento	83>67	2,61	1,32
25/09/18	Laranja	85>69,2	2,63	4,80
25/09/18	Ginja	83>67	2,54	1,34
7/11/18	Milho	85>69,2	4,15	3,69
7/11/18	Uva	83>67	2,80	1,94
7/11/18	Brócolos	83>67	2,26	2,81
7/11/18	Abóbora	85>69,2	3,01	3,96

9.6 Incerteza da medição

Foram determinadas as incertezas associadas à precisão e exatidão do método, a incerteza combinada e a incerteza expandida.

Para o cálculo da incerteza associada à precisão utilizou-se a equação descrita anteriormente em 7.1.7.1, onde o CA é igual a 20, que é o valor limite do critério de aceitação do desvio padrão da precisão verificada nos replicados. Relativamente à incerteza associada à exatidão do método, a incerteza combinada e a incerteza expandida foram determinadas a partir das equações referidas anteriormente em 7.1.7.2 e 7.1.7.3, respetivamente.

O critério de aceitação para a validação deste parâmetro segundo o SANTE, 2017 consiste no cálculo da incerteza expandida ser inferior a 50%. Como se pode verificar ao analisar os resultados representados nas tabelas 9.37 e 9.38, a incerteza expandida para os cloratos e percloratos em todas as matrizes em estudo cumpre com o critério de aceitação.

No estudo do método para a determinação dos percloratos a matriz que apresenta uma percentagem maior de incerteza expandida é a ginja (24,35) enquanto que a abóbora é a matriz com a menor percentagem (23,21). No caso da determinação dos cloratos, a matriz com maior percentagem de incerteza é a laranja com 24,50 e com menor a ginja com 23,16.

Verifica-se que não existe uma grande variação nos valores obtidos para a incerteza expandida entre as diferentes matrizes. Isto deve-se principalmente ao facto da componente exatidão apresentar valores relativamente próximos entre as matrizes.

A incerteza expandida obtida para cada matriz foi comparada com todos os critérios de validação, tendo-se verificado que este parâmetro foi o que obteve o valor mais elevado, que era o espectável.

Tabela 9.37: Análise dos resultados obtidos na quantificação das incertezas de medição na determinação de percloratos.

Matriz	Quantificação da Incerteza associada à Precisão (Uprec)	Quantificação da Incerteza associada à Exatidão (UExact)	Cálculo da Incerteza combinada	Cálculo da Incerteza expandida
Arroz	11,55	2,23	11,76	23,52
Tomate	11,55	2,23	11,76	23,52
Cenoura	11,55	2,32	11,78	23,55
Pimento	11,55	1,37	11,63	23,26
Laranja	11,55	1,62	11,66	23,32
Ginja	11,55	3,86	12,18	24,35
Uva	11,55	1,43	11,64	23,27
Milho	11,55	3,45	12,05	24,10
Brócolos	11,55	2,46	11,81	23,61
Abóbora	11,55	1,15	11,60	23,21

Tabela 9.38: Análise dos resultados obtidos na quantificação das incertezas de medição na determinação de cloratos.

Matriz	Quantificação da Incerteza associada à Precisão (Uprec)	Quantificação da Incerteza associada à Exactidão (UExact)	Cálculo da Incerteza combinada	Cálculo da Incerteza expandida
Arroz	11,55	1,92	11,71	23,41
Tomate	11,55	2,14	11,74	23,49
Cenoura	11,55	1,16	11,60	23,21
Pimento	11,55	1,92	11,70	23,41
Laranja	11,55	4,08	12,25	24,50
Ginja	11,55	0,90	11,58	23,16
Uva	11,55	2,71	11,86	23,72
Milho	11,55	4,07	12,24	24,48
Brócolos	11,55	5,67	12,86	25,73
Abóbora	11,55	1,73	11,68	23,35

9.7 Teores de cloratos e percloratos obtidos para as matrizes em estudo

O teor de cloratos obtido nas matrizes de brócolos, tomate e cenoura foi superior ao LMR (0,0100 mg/kg) recomendado pela EFSA (Tabela 9.39).

O teor de cloratos na matriz brócolos foi de 0,0690 mg/kg, sendo este valor superior ao LMR (>0,0100 mg/kg), o mesmo se verificou num estudo realizado por Horlacher e colaboradores, onde foi obtido um valor de 0,97 mg/kg (Horlacher *et al.*, 2014).

No caso da matriz tomate obteve-se uma concentração de 0,0216 e 0,0228 mg/kg de cloratos no dia 27/8 e 25/9, respetivamente. Segundo um estudo de Nieto foi observado um valor de 0,2 mg/kg de cloratos em tomates da França (Nieto, 2016).

Para a cenoura do dia 7/11, a concentração de cloratos foi de 0,0133 mg/kg, enquanto que no dia 25/9 a concentração foi inferior ao LQ. Um estudo recente realizado por Nawaz e Hetmanski, mostrou concentrações de cloratos na cenoura entre 0,081 e 0,110 mg/kg (Nawaz & Hetmanski, 2017).

No caso das matrizes arroz, uva, laranja, milho, pimento, ginja e abóbora as concentrações de cloratos obtidas foram inferiores ao LMR.

Em relação às concentrações de percloratos, verificou-se que para todas as matrizes foi inferior ao LQ, com a exceção da ginja para a qual se obteve uma concentração de 0,0127 mg/kg. Contudo a concentração obtida para a ginja é inferior ao LMR (0,1 kg/ml), estabelecido pela EFSA para os frutos e legumes.

Segundo um estudo de Nawaz a laranja, a uva, a cenoura, e o pimento apresentam concentrações de percloratos inferiores ao LQ (0,01 mg/kg) (Nawaz, 2016).

Tabela 9.39: Concentrações obtidas de cloratos e percloratos (mg/kg) para as matrizes em estudo.

Data	Matriz	Percloratos (mg/kg)	Cloratos (mg/kg)
27/8/18	Tomate	<LQ	0,0216
27/8/18	Arroz	<LQ	<LQ
25/9/18	Arroz	<LQ	<LQ
25/9/18	Cenoura	<LQ	<LQ
25/9/18	Pimento	<LQ	<LQ
25/9/18	Tomate	<LQ	0,0228
25/9/18	Laranja	<LQ	<LQ
25/9/18	Ginja	0,0127	<LQ
7/11/18	Pimento	<LQ	<LQ
7/11/18	Uva	<LQ	<LQ
7/11/18	Milho	<LQ	<LQ
7/11/18	Cenoura	<LQ	0,0133
7/11/18	Brócolos	<LQ	0,0690
7/11/18	Abóbora	<LQ	<LQ

9.8 Análise de amostras reais

As matrizes sopa de vegetais, creme de abóbora e creme de vegetais, são amostras que foram enviadas por um cliente para a SGS para a determinação de cloratos e percloratos, servindo como amostras reais utilizadas para a verificação do desempenho do método em trabalho de rotina.

Nas tabelas 9.40 e 9.41 encontram-se representadas as equações das retas de calibração para a determinação dos percloratos e cloratos nas sopas, respectivamente. Pode-se verificar que as retas apresentam coeficientes de determinação entre 0,9995 e 0,9999, cumprindo o critério de aceitação de $r > 0,9950$.

Tabela 9.40: Equações das retas efetuadas em matriz para a determinação dos percloratos e respetivos coeficientes de determinação (R^2).

Percloratos					
Data	Matriz	Ião Quant.	Equação da Reta	Declive (m)	R^2
25/9/18	Sopa de Vegetais	101>85	$y = 7 \times 10^6 x + 9341,9$	7428080,2	0,9999
25/9/18	Creme de Abóbora	101>85	$y = 5 \times 10^6 x - 216,97$	5335320,6	0,9999
25/9/18	Creme de vegetais	99>83	$y = 2 \times 10^7 x - 32101$	22443663,1	0,9999

Tabela 9.41: Equações das retas efetuadas em matriz para a determinação dos cloratos e respetivos coeficientes de determinação (R^2).

Cloratos					
Data	Matriz	Ião Quant.	Equação da Reta	Declive (m)	R^2
25/9/18	Sopa de Vegetais	85>69,2	$y = 1 \times 10^7 x - 33193$	14350319,9	0,9999
25/9/18	Crema de Abóbora	85>69,2	$y = 1 \times 10^7 x - 331561$	12471297,9	0,9998
25/9/18	Crema de vegetais	85>69,2	$y = 1 \times 10^7 x - 35120$	14578477,5	0,9995

Nas tabelas 9.42 e 9.43 encontram-se os valores obtidos da percentagem de recuperação de 0,0500, 0,100 e 0,500 mg/kg de percloratos e cloratos, respetivamente, nas matrizes sopa de legumes, crema de abóbora e crema de vegetais. No caso da taxa de recuperação de percloratos na matriz sopa de legumes foi entre 92,2 e 100 %, para o crema de abóbora foi entre 93,9 a 119 % e para o crema de vegetais foi entre 94,2 a 107 %. Dessa forma pode-se concluir que os valores encontram-se dentro dos critérios de aceitação (70-120%).

As taxas de recuperação para a concentração de 0,0500 mg/kg de cloratos nas diferentes sopas excederam os limites de aceitação. Na sopa de legumes a percentagem de recuperação foi de 124, no crema de abóbora foi 122 e crema de vegetais foi de 133. Isto deve-se ao facto destas amostras apresentarem uma quantidade elevada deste analito, 0,280, 0,240 e 0,352 mg/kg, respetivamente.

Para as concentrações de 0,100 e 0,500 mg/kg obtiveram-se taxas de recuperação aceitáveis para todas as matrizes.

Tabela 9.42: Ensaios de recuperação com 0,0500, 0,100 e 0,500 mg/kg de percloratos nas amostras reais.

Data	Matriz	Ião Quant.	Conc. Adicionada (mg/kg)	Conc. de analito nativo na amostra (mg/kg)	Conc. obtida da amostra sem analito nativo (mg/kg)	Rec. %
25/09/18	Sopa de Legumes	101>85	0,0500	<LQ	0,0490	98,0
			0,100	<LQ	0,100	100
			0,500	<LQ	0,461	92,2
25/09/18	Crema de Abóbora	101>85	0,0500	<LQ	0,0585	117
			0,100	<LQ	0,0120	119
			0,500	<LQ	0,469	93,9
25/09/18	Crema de Vegetais	99>83	0,0500	<LQ	0,0501	100
			0,100	<LQ	0,108	107
			0,500	<LQ	0,471	94,2

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Tabela 9.43: Ensaios de recuperação com 0,0500,0,100 e 0,500 mg/kg de cloratos nas amostras reais.

Data	Matriz	Ião Quant.	Conc. Adicionada (mg/kg)	Conc. de analito nativo na amostra (mg/kg)	Conc. obtida da amostra sem analito nativo (mg/kg)	Rec. %
25/09/18	Sopa de Legumes	85>69,2	0,0500	0,280	0,0622	124
			0,100	0,280	0,106	106
			0,500	0,280	0,472	94,4
25/09/18	Crema de Abóbora	85>69,2	0,0500	0,240	0,0612	122
			0,100	0,240	0,118	118
			0,500	0,240	0,429	85,9
25/09/18	Crema de Vegetais	85>69,2	0,0500	0,352	0,0667	133
			0,100	0,352	0,119	119
			0,500	0,352	0,465	93,1

10. Conclusões

Esta dissertação de mestrado teve como principal objetivo a validação de um método cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS, no laboratório da SGS Portugal.

O método de cromatografia de ultra eficiência acoplado à espectrometria de massa em *tandem* revelou ser adequado para a determinação de cloratos e percloratos nas matrizes em estudo. E o método QuPPe demonstrou ser eficiente na extração destes contaminantes.

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que a linearidade foi verificada entre as concentrações de 0,0100 e 0,100 mg/kg para as matrizes de frutos e vegetais e de 0,0100 e 0,200 mg/kg para as matrizes dos cereais, uma vez que se obtiveram coeficientes de correlação superiores a 0,9950 e o teste dos residuais mostrou que os pontos de calibração não apresentam desvios significativos ($\pm 20\%$). Em relação aos limiares analíticos pode-se constatar que para todas as matrizes obteve-se o LQ (0,0100 mg/kg) e LD (0,00300 mg/kg) esperados.

Em relação à repetibilidade e precisão intermédia a metodologia encontra-se validada para as matrizes de vegetais, frutos e cereais, para cloratos e percloratos, visto que o CV foi inferior ao critério de aceitação de 20%. Os ensaios dos duplicados em condições de repetibilidade e precisão intermédia obtiveram valores de amplitude relativa inferiores a 20% para todas as matrizes em estudo.

A exatidão do método foi determinada através de testes de recuperação. Os testes de recuperação para todas as matrizes em estudo foram realizados através de ensaios de fortificação com duas concentrações diferentes de cloratos e percloratos dentro da gama de trabalho considerada. Tendo em conta que o critério de aceitação é entre 70-120% a exatidão do método foi confirmada para todas as matrizes, com a exceção dos brócolos, no qual os valores de recuperação de cloratos excederam os limites de aceitação, possivelmente devido à amostra estar positiva em relação a este analito. Sendo dessa forma importante fazer os ensaios de recuperação em matrizes sem analito nativo ou com concentrações muito baixas.

Foram determinadas as incertezas associadas à precisão e exatidão do método procedendo-se de seguida ao cálculo da incerteza expandida. Atendendo que o critério de aceitação para a validação deste parâmetro é a incerteza expandida ser inferior a 50%, considera-se este parâmetro validado.

A análise das amostras reais, nomeadamente, sopa de vegetais, creme de abóbora com manjerição e creme de vegetais com espinafres obtiveram valores de cloratos quantificáveis e valores de percloratos inferiores ao LQ.

Como perspetiva futura, seria importante a realização de ensaios interlaboratoriais e/ou a utilização de materiais de referência certificados como outra forma de avaliar a exatidão do método.

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Referências Bibliográficas

- Agilent Technologies, 2016. “The LC Handbook Guide to LC Columns and Method Development”, USA, pp. 13-16.
- Ali, J., Linke, S., Pereira, L., 2013. “Robust Separation of Polar Compounds Utilizing Porous Graphitic Carbon (PGC)”. *Chromatography Today*, 17-21.
- Ali, S. N., Ahmad, M. K., Mahmood, R., 2016. “Sodium chlorate, a herbicide and major water disinfectant byproduct, generates reactive oxygen species and induces oxidative damage in human erythrocytes”. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 1898–1909.
- Anastassiades, M., Kolberg, D., Benkenstein, A., Eichhorn, E., Zechmann, S., Mack, D., Wildgrube, C., Sigalov, I., Dörk, D., Barth, A., 2017. Quick Method for the Analysis of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS/MS involving Simultaneous Extraction with Methanol (QuPPE-Method). Version 9.3, EURL-SRM.
- ATSDR, 2008. Toxicological profile for perchlorates. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, pp. 1-299, Atlanta, Georgia, USA.
- Balogh, M., 2008. “MS - The Practical Art”. *LCGC North America*, 26, 1011-1012.
- Bathina G., Yadla M., Burri S., Enganti R., Ch, R., Deshpande P., Ch R., Prayaga A., Uppin M., 2013. “An unusual case of reversible acute kidney injury due to chlorine dioxide poisoning”. *Renal Failure*, 35, 1176–1178.
- Braithwaite, A., Smith, J., 1999. “Chromatographic Methods”. Fifth Edition, Braithwaite, A., Smith, J. (eds), pp. 17-30, Springer Dordrecht, Heidelberg, Germany.
- Brown G., Gu B., 2006. “The Chemistry of Perchlorate in the Environment”. In: *Perchlorate*. Gu B., Coates J.D. (eds), pp. 17-47, Springer, Boston, MA.
- Cao, F., Jaunat, J., Sturchio, N., Cances, B., Morvan, X., Devos, A., Barbin, V., Oliver, P., 2019. “Worldwide Occurrence and Origin of Perchlorate ion in Waters: A Review”. *Science of the Total Environment*, 661, 737-749.
- Cassiano, N., Barreiro, J., Martins, L., Oliveira, R., Cass, Q., 2009. “Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas”. *Química Nova*, 32, 1021-1030.
- Constantinou, P., Louca-Christodoulou, D., Agapiou, A., 2019. “LC-ESI-MS/MS determination of oxyhalides (chlorate, perchlorate and bromate) in food and water samples, and chlorate on household water treatment devices along with perchlorate in plants”. *Chemosphere*, 235, 757-766.
- Coskun, O., 2016. “Separation Techniques: Chromatography”. *Northern Clinics of Istanbul*, 3, 156-160.
- CDC, 2017a. “How Food Gets Contaminated - The Food Production Chain”. Disponível em: <https://www.cdc.gov> (acedido a 20/05/2019).
- CDC, 2017b. “Perchlorates Factsheet”. Disponível em: <https://www.cdc.gov> (acedido a 6/04/2019).

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Cielecka-Piontek, J., Zalewski, P., Jelińska, A., Garbacki, P., 2013. "UHPLC: The Greening Face of Liquid Chromatography". *Chromatographia*, 76, 1429-1437.

CIPAC/3807/2003. Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations. Collaborative International Pesticides Analytical Council, 1-11.

CVUA Stuttgart, 2016. "QuEChERS e QuPPE - os multi-métodos na análise de pesticidas". Disponível em <http://www.cvuas.de> (acedido em 20 de Maio de 2019).

Dass, C., 2007. "Tandem mass spectrometry". In: *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. Dass, C., (ed), pp. 75-79, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA.

Dong, M., 2019. "HPLC/UHPLC Instrumentation and Trends". In: *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists*. Dong, M. (ed), pp.81-115, John Wiley & Sons, USA.

EFSA, 2015a. "Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of perchlorate in food, in particular fruits and vegetables". *EFSA Journal*, 12(10), 3869.

EFSA, 2015b. "Risks for public health related to the presence of chlorate in food". *EFSA Journal*, 13(6), 4135.

EFSA, 2017. "Dietary exposure assessment to perchlorate in the European population". *EFSA Journal*, 15-(10), 5043.

Eith, C., Kolb, M. Rumi, C., Seubert, A., 2007. "Practical Ion Chromatography An Introduction". 2nd edition, Viehweger, K. (eds), 8-13, Metrohm, Herisau, Switzerland.

El-Anead A., Cohen A., Banoub J., 2009. "Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers". *Applied Spectroscopy Reviews*, 44, 210-230.

Ellison, S., Barwick, V., Farrant, T. 2009. "Practical Statistics for the Analytical Scientist". 2nd Edition. Ellison, S., Barwick, V., Farrant, T. (eds), pp. 48-52, RSC Publishing, Cambridge, UK.

Ellison, S., Williams, A., 2012. "Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement". Third edition, Ellison, S., Williams, A., (eds), pp. 2-29. Disponível em <http://www.eurachem.org>. (acedido em 20 de Julho de 2019).

EMA/CVMP/VICH/463202/2009, Guidelines for the Validation of Analytical Methods used in Residue Depletion Studies. European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections, London.

EPA, 2008. "Interim drinking water health advisory for perchlorate". U.S. Environmental Protection Agency, 822-R-08-025.

EPA, 2014. "Technical fact sheet-perchlorate". United States Environmental Protection Agency, 505-F-14-003.

EPA, 2016. "Six-Year Review 3 Technical Support Document for Chlorate". U.S. Environmental Protection Agency, 810-R-16-013.

FAO/WHO, 2009. "Benefits and risks of the use of chlorine-containing disinfectants in food production and food processing": Report of a joint FAO/WHO Expert Meeting Ann Arbor, USA.

Fountain, K., Iraneta, P., 2012. "Instrumentation and Columns for UHPLC Separation". In: UHPLC in Life Sciences. Guillardie, D., Veuthey, J., (eds), pp. 29-66, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

Garcia, P., Buffoni, E., Gomes, F., Quero, J., 2011. "Analytical Method Validation". In: Wide Spectra of Quality Control, Akyar, I. (ed), pp. 3-20, InTech Janeza Trdine, Rijeka, Croatia.

Gil, M., Marín, A., Andujar, S., Allende, A., 2016. "Should chlorate residues be of concern in fresh-cut salads?". Food Control, 60, 416-42.

Guillardie, D., Veuthey, J., 2017. "Theory and practice of UHPLC and UHPLC-MS". In: Handbook of Advanced Chromatography/Mass Spectrometry Techniques. Holcapek, M. Brydwell, W. (eds), pp.1-38, Elsevier, USA.

Hoffmann, E., Stroobant, V. 2007. Mass Spectrometry - Principles and Applications 3rd Edition. Hoffmann, E., Stroobant, V. (eds), pp. 43-169, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England.

Holcapek, M., Jirásko, R., Lísá, M., 2010. "Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules". Journal of Chromatography A, 1217, 3908-3921.

Horlacher, I., Scherbaum, E., Kolberg, D., Wildgrube, C., 2014. "Chlorate Residues in Plant-Based Food: Origin Unknown". CVUA Stuttgart, Disponível em <http://www.cvuas.de> (accedido em 14 de Setembro de 2019).

HSE, 2002. Guidelines for Validation of Analytical methods for Non-Agricultural Pesticide Active Ingredients and Products. 1-15.

Hussain, S., Shaikh, T., 2016. "Ultra-high performance liquid chromatography (UPLC): A new trend in analysis". World journal of pharmaceutical research, 3, 387-394.

ICH, 2005. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use, 1-13.

INMETRO/DOQ-CGCRE-008/2003. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, 25-27.

IAS, 2016. "Guidelines for Food Testing Laboratories". International Accreditation Service, 1-36.

IPAC, G., 2011. Guia para a Acreditação de Laboratórios Químicos, 1-12.

Ismail, B., Nielsen, S., 2010. "Basic Principles of Chromatography". Food Analysis, 27, 473-498.

ISO 1990. Water quality-calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1, 8466-1.

Jorgenson, J., 2010. "Capillary Liquid Chromatography at Ultrahigh Pressures". Annual Review of Analytical Chemistry, 1, 129-150.

Laskowski, W., Górska-Warsewicz, H., Rejman, K., Czeczotko, M., Zwolińska, J., 2019. "How Important are Cereals and Cereal Products in the Average Polish Diet?". Nutrients, 11, 1-22.

Kamoshita, M., Kosaka, K., Asami, M., Matsuoka, Y., 2009. "Analytical Method for Perchlorate in Water by Liquid Chromatography-mass Spectrometry Using an Ion Exchange Column". Analytical Sciences, 25, 453-456.

Kumarathilaka, P., Oze, C., Indraratne, P., Vithanage M., 2016. "Perchlorate as an emerging contaminant in soil, water and food". Chemosphere, 150, 667-677.

Kuppusamy, M., Kaliyaperumal, S., 2013. "Comparison of Methods for detecting Outliers". International Journal of Scientific & Engineering Research, 4, 709-714.

Locatelli, M., Melucci, D., Carlucci, G., Locatelli, C., 2012. "Recent Hplc Strategies to Improve Sensitivity and Selectivity for the Analysis of Complex Matrices". Instrumentation Science & Technology, 40, 112-137.

Lucci, P., Busquets, R., Núñez, O., (2014). "UHPLC – MS (/MS) Analysis of Pesticides in Food". In: Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry Evaluation and Applications in Food Analysis. Naushad, M., Khan, M., (eds), pp. 18-20. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA.

Magnusson, B., Örnemark, U., 2014. "Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics". 2nd Edition, Magnusson, B., Örnemark, U., (eds.), 20-37. Disponível em <http://www.eurachem.org>. (acedido em 15 de Agosto de 2019).

Makarov A., Scigelova M., 2010. "Coupling liquid chromatography to orbitrap massspectrometry". Journal of Chromatography A, 1217, 3938-3945.

Maldaner, L., Jardim, I., 2009. "O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência". Quimica Nova, 32, 214-222.

Maldaner, L., Jardim, I., 2012. "UHPLC- Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes". Scientia Chromatographica, 3, 197-207.

McCarthy, W., O'Callaghan T., Danahar, M., Gleeson, D., O'Connor, C. Fenelon, A. Tobin, J., 2018. "Chlorate and Other Oxychlorine Contaminants Within The Dairy Supply Chain". Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 17, 1561-1575.

Mcmaster, M., 2005. LC/MS A Practical User's Guide. McMaster, M. (eds), pp. 64-66, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA.

NATA, 2012. Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods. 8-11, Australia.

Nagy, K., Vékey, K. 2008. "Separation methods". In: Medical Applications of Mass Spectrometry, Vékey, K., Telekes, A., Vertes, A. (eds), pp. 61-89, Elsevier Science, Boston, USA.

Nawaz, S., Hetmanski, M., 2017. "Monitoring of Chlorate in Fruit and Vegetables Report to Food Standards Agency", FERA, 1-20.

Nawaz, S., 2016. “An investigation of perchlorate levels in fruit and vegetables consumed in the UK”, FERA, 1-39.

Nesterenko, P., Palamareva, M., 2018. “Liquid Chromatography: Principles”. In: Encyclopedia of Analytical Science, Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C., (eds), pp. 231-237, Elsevier, Oxford, UK.

Nguyen, D., Guillarme, D., Rudaz, S., Veuthey, J., 2006. “Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure”. Journal of Separation Science, 29, 1836-1848.

Niessen, W. 2006. Liquid Chromatography – Mass Spectrometry 3rd Edition. Niessen, W. (ed), pp. 3-38, Taylor & Francis Group, New York, USA.

Nieto, J., 2016. “Implicaciones de la presencia de cloratos y percloratos en la producción de alimentos ecológicos”. Conference: Actas del XII Congreso SEAE. Leguminosas: Clave en la gestión de los agrosistemas y la alimentación ecológica, Lugo, Espanha.

Nováková, L., Holčapek, M., Jirásko, R., Lisa, M. 2012. “UHPLC/MS Coupling: How to Select A Suitable Configuration?”. In: UHPLC In Life Sciences. Guillarme, D., Veuthey, J. (eds), pp. 186-189, RSC Publishing, UK.

Omeroglu, P., Ambrus, Á., Boyacioglu, D., 2018. “Uncertainty of pesticide residue concentration determined from ordinary and weighted linear regression curve”. Food Additives & Contaminants: Part A, 35, 1324-1339.

Patil, A., 2015. “A Review On Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)”. Asian Journal of Pharmaceutical Technology & Innovation, 10, 86-96.

Pavia, D., Lampman, G., Kriz, G., Vyvyan, J., 2015. “Mass Spectrometry”. In: Introduction to spectroscopy, Pavia, D., Lampman, G., Kriz, G., Vyvyan, J. (eds), pp.390-395, Thomson Learning, Washington, USA.

Pleus, R., Corey, L., 2018. “Environmental exposure to perchlorate: A review of toxicology and human health”. Toxicology and Applied Pharmacology, 358, 102-109.

Reddy, T., Balammal, G., Kumar, A., 2012. “Ultra Performance Liquid Chromatography: An Introduction and Review”. International Journal of Pharmaceutical Research & Analysis, 1, 24-31.

Regulamento (CE) N.º865/2008, da Comissão. De 10 de novembro de 2008 relativa à não inclusão da substância ativa clorato no anexo I da Diretiva 91/414/CEE, 2008 do Conselho e à retirada das autorizações dos produtos fitofarmacêuticos que contêm essa substância. Jornal Oficial da União Europeia, 18.11.2008, L307/7. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/homepage.html> (acedido em 5 de julho de 2019).

Relacre, G., 2000. Validação de métodos internos de ensaio em análise química. Lisboa: Relacre, 13, 7-21.

Relacre, G., 2018. Quantificação de Incerteza de Medição em Ensaaios Químicos. Lisboa: Relacre, 31, 19-40.

Ribani, M.; Bottoli, C., Collins, C., Jardim, I., Melo, L., 2004. “Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos”. Química Nova, 27, 771-780.

SANCO/12495/2011. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. European Commission.

SANTE/11813/2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. Safety of the Food Chain Pesticides and Biocides, European Commission.

Schreiber, A., 2010. "Advantages of Using Triple Quadrupole over Single Quadrupole Mass Spectrometry to Quantify and Identify the Presence of Pesticides in Water and Soil Samples". Ontario, Canada: AB SCIEX.

SGS, 2019a. Sobre a SGS (SGS Briefing). Disponível em: <https://www.sgs.pt/pt-pt/our-company/about-sgs/sgs-in-brief>. (acedido em 20 de abril de 2019).

SGS, 2019b. SGS Group History. Documento informativo do Grupo SGS, 8.

SGS, 2019c. A SGS Portugal. Disponível em: <https://www.sgs.pt/pt-pt/our-company/about-sgs/sgs-in-brief/sgs-in-portugal> (acedido em 20 de Abril de 2019).

SGS 2019d. SGS Group Profile. Documento informativo do Grupo SGS, 8. SGS

Siddhant, M., Smita, G. Vaishali, J., Ashish, J., 2018. "HPLC- high performance liquid chromatography & UPLC – ultra performance liquid chromatographic system – a review on modern liquid chromatography system". Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences, 5, 7590-7602.

Skoog, D., West, D., Holler, F., Crouch, S., 2014. Fundamentals of Analytical Chemistry 9th Edition. Skoog, D., West, D., Holler, F., Crouch, S. (eds), pp.874-878, Brooks/Cole, USA.

Slavin, J., Lloyd, B., 2012. "Health Benefits of Fruits and Vegetables. Advances in Nutrition". Advances in Nutrition an Internacional Review Journal, 3, 506-516.

Spaggiari, D., Fekete, S., Eugster, P. Veuthey, J., Geiser, L., Rudaz, S. Guilleme, R., 2013. "Contribution of various types of liquid chromatography mass spectrometry instruments to band broadening in fast analysis". Journal of Chromatography A, 1310, 45-55.

Srinivasan, A., Viraraghavan, T., 2009. "Perchlorate: Health Effects and Technologies for Its Removal from water Resources". Internacional Journal of Environmental Research and Public Health, 6, 1418-1442.

Swartz, M., 2005. "UPLC: An Introduction and Review". Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 28, 1253-1263.

Thermo Fisher Scientific, 2007. "Method Development Guide for Hypercarb Columns", Runcorn, UK, pp. 1-8.

Thompson, M., Ellison, S., Wood, R., 2002. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. IUPAC Technical Report. Pure and Applied Chemistry, 74, 835-855.

Turner, J., Jenkins, K., 2018. "The Evolution of Ultra High-Performance Liquid Chromatography: Expanding the Future of Separation Technologies". Chromatography Today, 32-36.

UNODC, G., 2009. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. 8-13, Vienna, Áustria.

Vicente, J., Romero, J., Broch, S., 2015. “Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An Overview”. Analytical Separation Science, 5, 1757-1808.

Vogeser, M., Parhofer, K., 2007. “Liquid Chromatography Tandem-mass Spectrometry (LC-MS/MS) - Technique and Applications in Endocrinology”. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes, 115, 559-570.

Waters, 2019. “BEH (Ethylene Bridged Hybrid) Technology”. Disponível em: <https://www.waters.com> (acedido em 2 de julho de 2019).

Weiss, J. (2016). Handbook of Ion Chromatography Fourth Edition. Weiss, J.(eds), pp. 15-21, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.

Wilkowska, A., Biziuk, M. 2011. “Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology”. Food Chemistry, 125, 803-812.

Anexo 1

Razão iônica

A correta seleção do íon quantificador para cada matriz é fundamental para a identificação e quantificação do composto que se pretende analisar.

Os principais fatores que afetam a razão iônica são: o efeito matriz com a presença de interferentes na matriz e a própria concentração de analito de interesse (sinal do composto).

No caso da determinação dos percloratos, comparando as matrizes arroz e tomate verifica-se que a razão iônica (%) da matriz arroz (27/08/18) variou muito ao longo dos seis pontos de calibração, obtendo um desvio padrão relativo de 75,27 (tabelas A1.1 e A1.2). Enquanto que no caso do tomate as razões iônicas variaram pouco, alcançando um desvio padrão relativo de 6,96 (27/08/18). Desta forma pode-se concluir que existe um efeito matriz mais intenso no arroz do que no tomate, devendo-se ter em conta este fator quando se confirma a presença do composto na amostra, devendo-se comparar as razões iônicas entre amostra e padrão de concentrações semelhantes, evitando possíveis falsos positivos ou falsos negativos. Contudo ao comparar o desvio padrão relativo da matriz arroz dos dois dias de análise (tabela A1.3), verifica-se que no dia 27/08/18 foi superior ao do dia 25/09/18, possivelmente a causa desta diferença foi a presença de interferentes da amostra de arroz do dia 25/09/18.

Ao se analisar a tabela A1.4, que representa os cloratos, percebe-se que ocorreu uma grande variação das razões iônicas na matriz brócolos, tendo um desvio padrão relativo de 103,35. Esta variabilidade pode ter ocorrido por os brócolos terem uma concentração de cloratos elevada, 0,069 mg/kg, uma vez que no caso dos percloratos não se verificou esta diferença, por este analito estar abaixo do LQ.

No caso dos cloratos no arroz 27/8 e 25/9, obteve-se um desvio padrão relativo baixo, 7,11 e 3,08, respetivamente, tendo ocorrido um efeito matriz menos acentuado do que na determinação dos percloratos.

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Tabela A1.1: Análise das razões iônicas na determinação de percloratos na matriz arroz.

Data	Matriz	Ião quant.	99>83	101>85	Razão Iônica %	Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo
27/08/18	Arroz	99>83	41835	157981	377,63	94,20	70,91	75,27
			90472	186287	205,91			
			188995	233014	123,29			
			506399	277692	54,84			
			844714	425414	50,36			
			1068628	391376	36,62			

Tabela A1.2: Análise das razões iônicas na determinação de percloratos na matriz tomate.

Data	Amostra	Ião Quant.	99>83	101>85	Razão Ionica %	Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo
27/08/18	Tomate	101>85	226057	55476	407,49	386,19	26,88	6,96
			312304	77203	404,52			
			608369	169987	357,89			
			929688	251941	369,01			
			1,3E+06	319605	413,32			

Tabela A1.3: Análise dos resultados obtidos para as razões iônicas na determinação de percloratos das matrizes em estudo.

Data	Amostra	Ião Quantificador	Ião Qualificador	Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo
27/08/18	Arroz	99>83	101>85	94,20	70,91	75,27
27/08/18	Tomate	101>85	99>83	386,19	26,88	6,96
25/09/18	Cenoura	99>83	101>85	188,75	58,73	31,12
25/09/18	Arroz	99>83	101>85	49,11	21,49	43,77
25/09/18	Ginja	99>83	101>85	69,27	26,16	37,76
25/09/18	Pimento	99>83	101>85	51,54	24,14	46,85
25/09/18	Tomate	101>85	99>83	577,11	259,94	45,04
25/09/18	Laranja	101>85	99>83	525,60	109,75	20,88
7/11/18	Abóbora	99>83	101>85	22,15	3,86	17,41
7/11/18	Cenoura	99>83	101>85	25,45	2,22	8,72
7/11/18	Milho	99>83	101>85	11,98	4,86	40,58
7/11/18	Pimento	99>83	101>85	23,03	3,86	16,76
7/11/18	Brócolos	99>83	101>85	20,71	3,46	16,73
7/11/18	Uva	99>83	101>85	21,08	4,73	22,42

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Tabela A1.4: Análise dos resultados obtidos para as razões iônicas na determinação de cloratos das matrizes em estudo.

Data	Amostra	Ião Quantificador	Ião Qualificador	Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo
27/08/18	Arroz	83>67	85>69,2	30,00	5,13	17,11
27/08/18	Tomate	83>67	85>69,2	27,59	1,40	5,08
25/09/18	Cenoura	83>67	85>69,2	148,63	7,98	5,37
25/09/18	Arroz	83>67	85>69,2	74,55	2,30	3,08
25/09/18	Ginja	83>67	85>69,2	174,70	40,26	23,04
25/09/18	Pimento	83>67	85>69,2	148	9,38	6,33
25/09/18	Tomate	83>67	85>69,2	69,51	8,67	12,47
25/09/18	Laranja	85>69,2	83>67	73,94	5,12	6,92
7/11/18	Abóbora	85>69,2	83>67	88,15	40,04	45,42
7/11/18	Cenoura	83>67	85>69,2	151,07	35,03	23,19
7/11/18	Milho	85>69,2	83>67	82,23	2,22	2,70
7/11/18	Pimento	83>67	85>69,2	148,89	32,29	21,69
7/11/18	Brócolos	83>67	85>69,2	211,48	218,59	103,35
7/11/18	Uva	83>67	85>69,2	162,87	23,56	14,47

Anexo 2

Reta Solvente

Inicialmente traçou-se retas em solvente e retas em matriz de forma a analisar quais seriam as mais adequadas para a determinação dos compostos em estudo.

Depois de se efetuar ensaios de recuperação nas diferentes matrizes verificou-se que a taxa de recuperação obtida através das retas em solvente em muitas matrizes estavam fora do critério de aceitação 70-120%, tendo-se dessa forma optado pelas retas em matriz para a validação do método.

As taxas de recuperação não aceitáveis obtidas através da reta solvente verificaram-se tanto para os percloratos como para os cloratos, contudo a título de exemplo vão ser apresentados os resultados para os cloratos.

Na tabela A2.1 encontra-se os padrões da reta de calibração em solvente de cloratos e respetivas áreas dos picos com a transição 85>69,2 e a figura A2.1 representa a respetiva reta de calibração. Nas tabelas A2.2 e A2.3 encontram-se representados os valores do ensaio de recuperação, da matriz da abóbora e milho fortificadas com 0,0300 mg/kg, respetivamente. A taxa de recuperação da matriz abóbora encontra-se entre os 24,0 e os 25,0%, devido ao elevado efeito de matriz. No caso do milho a taxa de recuperação foi aceitável, pois encontra-se dentro dos critérios de aceitação.

Na tabela A2.4 encontra-se os padrões da reta de calibração em solvente de cloratos e respetivas áreas dos picos com a transição 83>67 e a figura A2.2 representa a respetiva reta de calibração. A partir da tabela A2.5 pode-se perceber que a percentagem de recuperação da matriz cenoura fortificada com 0,0300 mg/kg, foi entre 55,1 e 56,5%, o que não é aceitável.

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

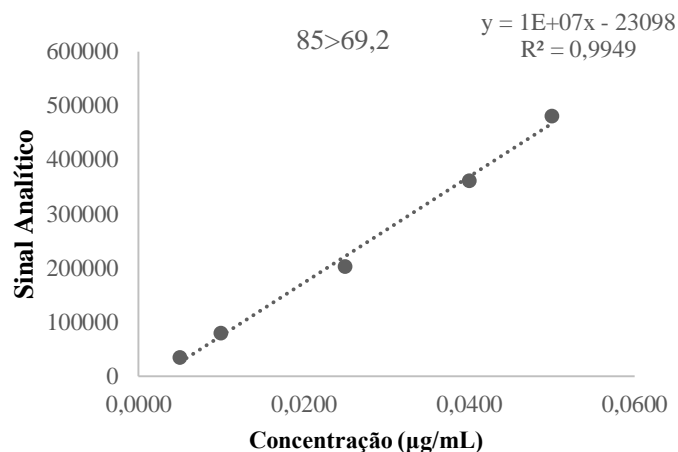


Figura A2.1: Reta de calibração em solvente dos cloratos na gama de concentrações 0,00500 a 0,0500 (µg/mL), na transição 85>69,2.

Tabela A2.1: Padrões da reta de calibração em solvente dos cloratos e respectivas áreas dos picos cromatográficos na transição 85>69,2.

Pontos de calibração	Conc. (µg/mL)	Área do Pico
1	0,00500	34466
2	0,0100	79352
3	0,0250	202605
4	0,0400	361673
5	0,0500	481097

Tabela A2.2: Ensaios de recuperação com 0,0300 mg/kg de percloratos na Abóbora, determinados pela reta solvente.

Data	Matriz	Transição Iônica	Conc. Adicionada (mg/kg)	Conc. Obtida (mg/kg)	Recuperação %
07/11/18	Abóbora	85 > 69,2	0,0300	0,00748	25,0
				0,00721	24,0
				0,00722	24,1
				0,00726	24,2
				0,00732	24,4

Implementação e validação de um método Cromatográfico para a determinação de Cloratos e Percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS/MS

Tabela A2.3: Ensaios de recuperação com 0,0300 mg/kg de cloratos no milho, determinados pela reta solvente.

Data	Matriz	Transição Iónica	Conc. Adicionada (mg/kg)	Conc. Obtida (mg/kg)	Recuperação %
07/11/18	Milho	85 > 69,2	0,0300	0,0233	77,6
				0,0244	81,2
				0,0231	76,9
				0,0239	79,7
				0,0238	79,4

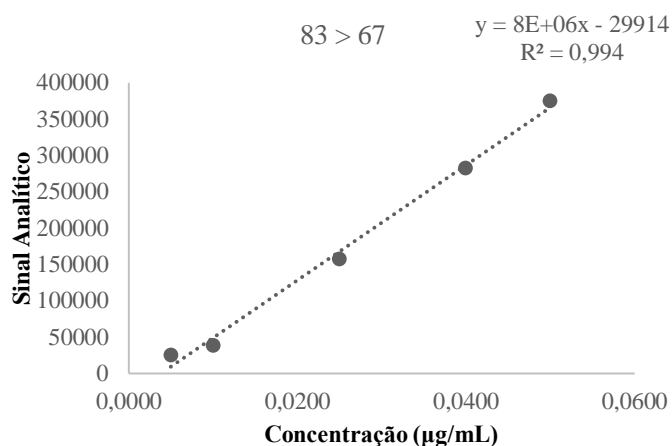


Figura A2.2: Reta de calibração em solvente dos cloratos na gama de concentrações 0,00500 a 0,0500 (µg/mL), na transição 83>67.

Tabela A2.4: Padrões da reta de calibração em solvente e respetivas áreas dos picos cromatográficos na transição 83>67.

Pontos de calibração	Conc. (µg/mL)	Área do Pico
1	0,00500	25516
2	0,0100	39226
3	0,0250	157652
4	0,0400	283204
5	0,0500	375399

Tabela A2.5: Ensaios de recuperação com 0,0300 mg/kg de cloratos na cenoura, determinados pela reta solvente.

Data	Matriz	Transição Iónica	Conc. Adicionada (mg/kg)	Conc. Obtida (mg/kg)	Recuperação %
07/11/18	Cenoura	83>67	0,0300	0,0167	55,5
				0,0160	53,4
				0,0165	55,1
				0,0168	55,9
				0,0169	56,5